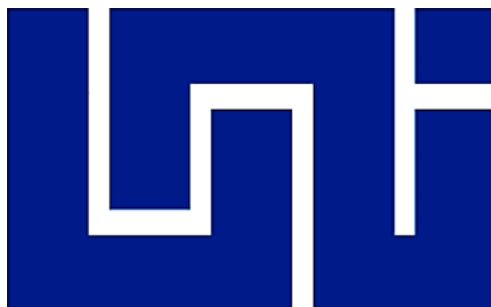


**Universidad Nacional de Ingeniería  
Facultad de Ingeniería Química**



**ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE DESECHOS  
DE CAMARÓN PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINA Y MATERIAL  
PROTEICO**

**TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:**

**Br. Manuel Omar García González**

**Para optar por el título de:**

**Ingeniero Químico**

**Tutor:**

**MPhil. Martha Benavente Silva**

**Asesor:**

**Tec. Alejandro Hernández**

**Managua, Nicaragua, Mayo 2019**

# **DEDICATORIA**

**A Dios y mi familia por su apoyo y dedicación: Mi madre María Lourdes García  
y hermana Paola Mereira García**

# AGRADECIMIENTO

A los profesores Juan Carlos García y Ernesto Acevedo por sus consejos y apoyo en mis primeros años de estudiante.

Un reconocimiento especial a mi tutora Martha Benavente por la confianza brindada para la realización del presente trabajo, por su apoyo moral, su paciencia y recomendaciones.

Así también, a los profesores Rodolfo Espinoza, Arnoldo Hidalgo, Juan Alonso, Leandro Paramo, Katia Montenegro (UNAN), Anielka Dávila (UNAN), por las recomendaciones brindadas.

Al profesor Alejandro Hernández por la capacitación brindada en temas de microbiología e identificación de bacterias.

Al personal del turno vespertino de la biblioteca Esmán Marín por toda su ayuda en mis años de estudiante, a la Licenciada Danelis Barrios Avilés del Centro de Documentación de la Facultad de Ingeniería Química. A Ronald José Baldelomar Cerda por su ayuda brindada en la recolección de lactosuero.

Al Laboratorio de Biotecnología y al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación CIRA UNAN Managua, por las capacitaciones brindadas sobre el trabajo en laboratorio.

A todos aquellos amigos que directa o indirectamente colaboraron con mi formación: Salvador Manuel Sánchez, Francisco Javier Urbina, Larissa Pérez González, mi tía Claudia García, Yamir Pérez, Amy Avellan Campos, Marcos Sandoval, Cristofer Masis, Elman López, Alex Ramírez, Maryan Liseth Romero, entre otros.

## OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

El trabajo de Diploma titulado ***"Estudio de la Fermentación Ácido Láctica de Desechos de Camarón para la Obtención de Quitina y Material Proteico "***, realizado por el Bachiller **Manuel García González**, es una valiosa e importante contribución a la recuperación de materiales valiosos a partir de desechos industriales, y un gran aporte a la detección e identificación de bacterias benéficas que puedan ser aprovechadas en procesos biotecnológicos.

Los desechos industriales de las empresas camaroneras y lácteas, los cuales pueden conducir al detrimento ambiental y la calidad de vida, permiten recuperar un material de origen biológico, aprovechable tal como la quitina y cepas o metabolitos microbianos. Este biopolímero puede ser utilizado para producir productos con un alto valor comercial, tales como quitosano, glucosamina y biofilms, los cuales tienen grandes aplicaciones en diferentes áreas tales como la farmacéutica, cosmética, ambiental, textil, y alimenticia.

En el desarrollo de este estudio, el Bachiller Manuel García González demostró una gran capacidad de trabajo, independencia, buena organización, responsabilidad y destreza en la resolución de problemas de carácter práctico, logrando con ello obtener excelentes resultados.

Como catedrático guía considero que este trabajo cumple con la calidad técnica y científica requerida, por lo que solicito a los honorables miembros del tribunal examinador evaluar el gran esfuerzo desarrollado y otorgar al Bachiller Manuel García González el título de Ingeniero Químico.

---

MPhil. Martha Benavente  
Tutora del estudio,  
Profesora Titular, UNI- FIQ

# RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto del rango de tamaño de partículas (menor a 3.35 mm y mayor a 3.35 mm), el tipo de sustrato (azúcar o melaza) y el porcentaje de inóculo (5 y 10%) en el rendimiento y la calidad de quitina obtenida por fermentación ácido-láctica del caparazón de camarón rojo, *Farfantepenaeus brevisrostris*. La calidad de la quitina producida se estableció por medio del grado de correlación de su espectro IR contra el de una muestra comercial de quitina. Así también, se comprobó cualitativamente y cuantitativamente, la presencia de proteínas en los residuos del proceso de fermentación.

El proceso fermentativo fue monitoreado por medio del pH y el porcentaje de acidez total titulable (ATT) debido al ácido láctico. Adicionalmente, se caracterizó e identificó las bacterias ácido-lácticas presentes en uno de los experimentos realizados. Las bacterias fueron aisladas en medio agar MRS; caracterizadas por su morfología y pruebas bioquímicas presuntivas; y finalmente fueron identificadas utilizando el sistema miniaturizado API 50 CH en conjunto con el medio API 50 CHL.

Los resultados mostraron que se obtuvo un rendimiento medio global de quitina del  $7.48 \pm 1.91\%$  basado en la masa inicial de desechos de camarón. La media global del grado de correlación del espectro IR de la quitina producida con respecto a la muestra comercial fue de  $90.84 \pm 1.87\%$ . Los mejores rendimiento y calidad de quitina se obtuvieron para tamaños de partícula en el rango de 0.45 a 3.5 mm y al utilizar melaza como sustrato. No se observó efecto de la concentración de inóculo para los valores experimentales de 5 y 10%.

En todos los experimentos, durante el proceso fermentativo se observó disminución de pH y aumento del ATT. La producción de ácido láctico fue superior para el rango de mayor tamaño de partículas y con melaza como sustrato. Se caracterizó tres colonias de bacterias ácido-lácticas de morfología celular: bacilar alargada, cocobacilo y bacilo corto. Las cepas presentes fueron *Lactobacillus paracasei* 1 y *Leuconostoc mesenteroides cremoris*, las cuales facilitaron la hidrólisis del material proteico presentes en la mezcla.

Por medio de la reacción xantoproteica se identificaron tres aminoácidos: fenilalanina, triptófano y uno no esencial, tirosina. El análisis del porcentaje promedio de proteínas en el material proteico fue de 1.60 %.

# TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA.....	III
RESUMEN .....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1    Objetivo General .....	3
2.2    Objetivos Específicos .....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1    Quitina.....	4
3.1.1 Fuentes de quitina .....	7
3.1.2 Método de obtención de la quitina .....	8
3.2    Fermentación Ácido Láctica .....	14
3.2.1 Bacteria ácido láctica (BAL).....	14
3.2.2 Clasificación y géneros representativos de la bacterias .....	15
3.2.3 Condiciones de crecimiento de las BAL.....	19
3.2.4 Número inicial de bacterias lácticas.....	21
3.2.5 Productos de fermentación ácido láctica .....	21
3.3    Aislamiento de bacterias ácidos lácticas.....	22
3.3.1 Catalasa.....	23
3.3.2 Oxidasa.....	23
3.3.3 Tinción de Gram. ....	23
3.4    Métodos de identificación microbiana .....	24
3.4.1 Métodos Fenotípicos.....	24
3.4.2 Micrométodos .....	24
3.4.3 Métodos Genotípicos .....	26
3.5    Proteínas.....	27
3.5.1 Determinación de proteínas totales por el método Kjeldahl.....	27
3.5.2 Reacción xantoproteica .....	29
3.6    Espectroscopia infrarroja .....	29
4. METODOLOGÍA.....	32
4.1    Universo .....	32

4.2 Materiales .....	32
4.3 Operación de variables .....	34
4.4.1 Desarrollo de Inóculo. Reactor Madre .....	35
4.4.2 Preparación de la materia prima .....	35
4.4.3 Proceso de Fermentación Láctica.....	36
4.4.4 Proceso Químico para purificar la quitina .....	36
4.4.5 Análisis espectral de la quitina.....	37
4.4.6 Aislamiento e Identificación de las bacterias .....	38
4.4.7 Análisis del material proteico .....	40
4.4.8 Diseño Experimental.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
5.1 Condiciones de operación en el proceso de fermentación láctica .....	43
5.1.1 Análisis de Espectros IR y grados de correlación .....	44
5.1.2 Análisis de ANOVA. Interacción de variables .....	47
5.2 Condiciones de operación en el proceso de fermentación láctica .....	49
5.2.1 Tamaño de partícula .....	49
5.2.2 Tipo de Sustrato.....	51
5.2.3 Nivel de inóculo.....	52
5.3 Aislamiento e Identificación de bacterias ácido láctica.....	53
5.4 Análisis de proteínas.....	57
6. CONCLUSIONES .....	60
7. RECOMENDACIONES.....	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
ANEXOS .....	66

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Estructura de la quitina.	4
Figura 3.2	Principales aplicaciones de la quitina.	7
Figura 3.3	Diagrama de bloques para la producción de quitina por el método químico.	10
Figura 3.4	Diagrama de bloques de fermentación ácido láctica para la obtención de quitina.	12
Figura 3.5	Diagrama del proceso de fermentación ácido láctica.	14
Figura 3.6	Principales tipos de formas bacterianas	16
Figura 3.7	Regiones de frecuencias de grupo y de la huella dactilar	30
Figura 4.1	(a) Reactor de un frasco de vidrio tipo schott con tapa, de autoclave +120°C, y (b) reactor en el proceso de fermentación de caparazón de camarón y suero lácteo enriquecido	33
Figura 4.2	Esquema de dilución para la determinación de la concentración de bacterias	38
Figura 4.3	(a) Aislamiento y seriado de dilución, (b) viales con cepas y (c) plantilla plástica del sistema miniaturizado API 50 CH	39
Figura 5.1	Espectros Ir de la quitina obtenida del Experimento 11 (Sample) y de la quitina comercial (Reference)	45
Figura 5.2	Resultados del grado de correlación y porcentaje de rendimiento de la quitina obtenida de los 24 experimentos	46
Figura 5.3	Comportamiento de pH y ATT a diferentes tamaños de partículas (Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm))	50
Figura 5.4	Comportamiento de pH y ATT usando diferentes sustratos (Azúcar y Melaza)	52
Figura 5.5	Comportamiento de pH y ATT usando diferentes concentraciones de inóculo (5 y 10%).	53
Figura 5.6	Colonias aisladas en agar MRS de la placa de dilución 6 del Experimento No. 4 de la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón, especie <i>Farfantepenaeus brevisrostris</i> , utilizando suero lácteo y azúcar sulfitada como sustrato	54
Figura 5.7	(a) Frotis en portaobjeto y (b) Tinción de gram	55
Figura 5.8	Muestras de proteína, producto de la fermentación ácido-láctica con la adición de ácido nítrico y (b) resultado positivo de la prueba	58
Figura A.1	Diagrama de flujos del proceso de obtención de quitina y proteína residual a partir de desechos de camarón	66



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Propiedades generales de la quitina.	5
Tabla 3.2	Composición química de algunas fuentes de materia prima para la obtención de quitina.	8
Tabla 3.3	Principales microorganismos y su eficiencia en la extracción biológica de quitina.	13
Tabla 3.4	Fundamento de diferenciación entre Gram + y Gram -	17
Tabla 3.5	Medios de cultivos para aislar bacterias ácido-lácticas.	23
Tabla 3.6	Principales factores de conversión	28
Tabla 3.7	Abreviada de las frecuencias de grupos orgánicos	31
Tabla 4.1	Tabla de operación de las variables.	37
Tabla 4.2	Factores y niveles del diseño experimental.	41
Tabla 4.3	Tabla de las variables de repuesta.	42
Tabla 5.1	Características de bacterias identificadas en el Experimento de fermentación ácido láctica No. 4	47
Tabla 5.2	Porcentaje de proteína en diferentes tipos de muestras	57
Tabla A.1	Algunos indicadores ácido/base importantes	67
Tabla A.2	Lista de reactivos para prueba de acidez total titulable.	68
Tabla A.3	Valores experimentales en determinación de humedad	71
Tabla A.4	Materiales para determinar la viscosidad del material proteico	75
Tabla A.5	Resultados Experimentales del diseño factorial	78
Tabla A.6	Resultados de pH y ATT de los Experimentos de fermentación ácido láctica en el Reactor Madre	79
Tabla A.7	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 1, 15 y 21.	80
Tabla A.8	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 2, 3 y 6.	81
Tabla A.9	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 4, 14 y 22	82
Tabla A.10	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 5, 11 y 17	83

Tabla A.11	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 8, 16 y 24	84
Tabla A.12	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 9, 13 y 18	85
Tabla A.13	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 10, 19 y 23	86
Tabla A.14	Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 7, 12 y 20	87
Tabla A.15	Determinación del Porcentaje de Humedad de caparazón de camarón	88
Tabla A.16	Datos del Análisis del rango de tamaño de partícula	88
Tabla A.17	muestras seleccionadas para el análisis de proteínas	89
Tabla A.18	Rendimiento final quitina	90
Tabla A.19	Grado de correlación de quitina (Análisis espectral IR)	91
Tabla A.20	Análisis de Varianza para Gr - Suma de Cuadrados Tipo III	92
Tabla A.21	Medias por Mínimos Cuadrados para Gr con intervalos de confianza del 95.0%	93
Tabla A.22	Análisis de Varianza para Pr - Suma de Cuadrados Tipo III	94
Tabla A.23	Medias por Mínimos Cuadrados para Pr con intervalos de confianza del 95.0%	95

# 1. INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de crustáceos tiene como objetivos promover la exportación de especie de camarones y langostas, generar empleo, asegurar la conservación de las especies y desarrollar los recursos bajo condiciones amigables con el medio ambiente.

Actualmente, en Nicaragua, existen quince plantas procesadoras de camarón y langostino; ocho de ellas se encuentran localizadas en la zona del Pacífico especialmente en los departamentos de Chinandega y León. Las exportaciones de camarón se han mantenido constantes desde el año 2008 con valores alrededor de los 46 millones de libras. Sin embargo, esta industria produce una gran cantidad de desechos, hasta de un 40 a 50 % del peso total de la producción (Xu, Gallert & Winter, 2008), los cuales se consideran contaminantes potencialmente peligrosos por su alta carga orgánica (Cabrera, 2010), pero representan una fuente de quitina que permite su aprovechamiento (Cabarcas-Lorduy, Marimón Bolívar, y Miranda Marzola, 2011).

Investigaciones centradas en la determinación de posibles usos de estos desechos con una doble finalidad: económica y ambiental, se han llevado a cabo en la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Escorcia, Hernández, Sánchez, y Benavente (2009) se enfocaron en el diseño y montaje de una planta piloto para la extracción química de quitina y proteínas a partir de desechos de crustáceos (camarón y langostino) utilizando procesos de obtención química

La extracción del biopolímero por el método químico involucra la desproteínización del material con hidróxido de sodio o de potasio y la desmineralización, o eliminación de las sales minerales, con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (Peniche, 2006; Escorcia et al., 2009; Colina et al., 2014). Este método es el más utilizado a nivel mundial, pero con el inconveniente que se utilizan altas concentraciones de ácidos y bases fuertes; así como, grandes volúmenes de agua, generando así contaminación ambiental.

Como alternativa a este proceso, se estudió el proceso microbiológico para la extracción de quitina por fermentación ácido láctica. En este estudio se afirma que este proceso tiene ventajas con respecto al tratamiento químico debido a que no produce desechos tóxicos, se mejora la calidad del producto y disminuye los costos de producción (Zakaria, 1997).

Pacheco-López (2010) evaluó el proceso de fermentación con bacterias ácido lácticas, encontrando que las condiciones de operación en intervalos de 20°C a 40°C, pH inicial de 3.6 y tamaño de partícula de 1 mm de diámetro, tienen una importante influencia en este proceso. Por su parte, Cira, Huerta, Hall y Shirai (2002) utilizaron sacarosa como sustrato en la fermentación ácido láctica de residuos de camarón para la recuperación de quitina, observándose en los resultados una

disminución de minerales y proteínas, después de 6 días de fermentación a 30°C y niveles de inóculos de 5% y 10 %.

Así también, Marcía, Malespín, Sánchez, y Benavente (2011) utilizaron bacterias ácido lácticas para la desproteínización y descalcificación del material de camarón y langostino en un reactor vertical, para la extracción de quitina]. En este estudio se evaluó las variables tiempo de fermentación (2 y 3 semanas) y uso de inóculo.

Los resultados de Marcía et al. (2011) mostraron que al fermentar cefalotórax de camarón durante dos semanas con parámetros iniciales de 10 % p/p de inóculo *lactobacillus spp*, 10% p/p de azúcar de caña como fuente de carbono y 75 % de suero lácteo se lograba mayor estabilidad del proceso y mayor desmineralización con porcentajes de recuperación de quitina del 85%. La comparación de los espectros infrarrojos de la quitina producida, comparada con una muestra de quitina comercial, mostró un porcentaje de correlación del 93-95 %, indicando que la quitina obtenida al utilizar el método combinado (Microbiológico-Químico), tiene un alto grado de pureza

En el presente estudio se evaluó el proceso de fermentación ácido láctica de desechos de camarón rojo de mar, *Farfantepenaeus brevisrostris* (Rivera, 2008), facilitados por la empresa Nica Fish, para la extracción de quitina y material proteico, considerando las siguientes variables independientes: concentración del inóculo (v/v), tipo de sustrato y tamaño de partícula; para determinar su influencia en la calidad de la quitina, del material proteico y en su rendimiento. Así también, se identificó el tipo de bacteria ácido láctica presentes en la fermentación y sus características morfológicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Estudiar la fermentación ácido láctica de los desechos de camarón para la obtención de quitina y material proteico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar el efecto del tamaño de partícula, concentración de inoculo y tipo de sustrato en el rendimiento y calidad de la quitina obtenida por fermentación ácido-láctica del caparazón de camarón rojo de mar, *Farfantepenaeus brevirostris*.
- Evaluar el comportamiento del proceso de fermentación ácido láctica a diferentes condiciones de operación.
- Caracterizar las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación.
- Comprobar cualitativamente y cuantitativamente la presencia de proteínas en los residuos líquidos del proceso de fermentación ácido láctica.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Quitina

La quitina es un polímero natural que está constituido por moléculas de N-acetil-D-glucosamina (Figura 3.1). Es un polisacárido no tóxico y biodegradable que se caracteriza por su insolubilidad en disolventes comunes (Cabarcas-Lorduy et al., 2011).

Pacheco-López (2010), por su parte, define la quitina como copolímeros lineales de residuos de N-glucosamina (D-GlcN) y N- Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante un enlace  $\beta$ -1,4 que produce una estructura rígida no ramificada.

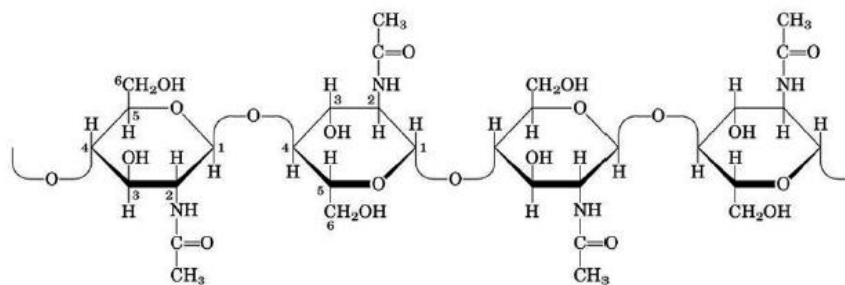


Figura 3.1 Estructura de la quitina ( Mármol et al., 2011).

Pacheco-López (2010) describe las propiedades físicas de la quitina y define que dependiendo del estado ya sea sólido o en solución, la quitina presenta diferentes propiedades. En el estado sólido, las propiedades dependen de la accesibilidad y la movilidad de las cadenas del polímero, parámetros relacionados con la cristalinidad y morfología. En solución, las propiedades dependen de los parámetros de solubilidad y conformación de la cadena.

Así también, Pacheco-López (2010) define que la presencia y abundancia de los grupos hidroxilos ( $O-H$ ) en las moléculas de quitina tiene tendencia a la formación de puentes de hidrogeno intra e intermoleculares que favorecen la formación de agregados lineales de alta cristalinidad.

Las cadenas de quitina forman puentes de hidrogeno mediante los grupos carbonilo ( $C=O$ ) y amino ( $H-N$ ), que a su vez forman puentes de hidrogeno con los anillos de azúcares vecinos. Además, entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo del C-6, existe otro puente de hidrogeno que se forma entre el grupo  $OH$  del C-3 y el oxígeno del anillo, lo que aumenta la rigidez de la cadena manteniendo una estructura altamente ordenada.

En la naturaleza se han detectado tres formas polimorfas de quitina,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -quitina. Comparando la abundancia natural de las formas polimorfas, se encuentra que la  $\alpha$ -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas cantidades que tiene la tendencia a ser transformadas en  $\alpha$ -quitina (Cira-Chavéz, 2000).

Según Pacheco-López (2010) distintos factores durante la extracción de la quitina puede influenciar en el peso molecular del biopolímero final (Tabla 3.1). Altas temperaturas y concentraciones de ácidos y alcalis así como largo tiempos de reacción, puede degradar y ocasionar depolimerización de las cadenas.

*Tabla 3.1 Propiedades generales de la quitina. Tomado de la Tabla 1.2 de Pacheco-López (2010), pp. 6.*

Propiedad	Quitina
<b>Peso Molecular (<math>\text{g.mol}^{-1}</math>)</b>	$1 \times 10^6$ a $2.5 \times 10^6$
<b>Grado de acetilación</b>	>40
<b>Viscosidad (Cps) 1 % en 1% Ac. Acético</b>	No soluble
<b>Humedad (% p/p)</b>	8-10
<b>Solubilidad</b>	DMAc-LiCl/TCA-MC

Los grupos aminos de la quitina se encuentra en forma acetilada, los cuales pueden estar unidos a cadenas proteicas o como aminas libres, no obstante durante los procesos comunes de extracción con ácidos y alcalis se produce una inevitable desacetilación. Las muestras de quitina presentan diferentes cantidades de grupos N-acetil que dependen del origen y del proceso de extracción del biopolímero, en general los grados de acetilación de la  $\alpha$ -quitina extraída se encuentran entre 90 y 95 % (Pacheco-López, 2010).

La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Para llevar a cabo la disolución de esta molécula, es necesario introducir disolventes que induce las repulsiones entre las cadenas o desequilibren los puentes de hidrógeno intermoleculares presentes en el estado sólido. Los disolventes que pueden cumplir con este propósito son la hexafluoracetona y la N,N-dimetilacetamida(DMAc) conteniendo 5-8 % de cloruro de litio (Pacheco-López, 2010).

Según estudios realizados por Pacheco-López (2010), la quitina tiene muchas aplicaciones en áreas como la biomedicina, la agricultura y operaciones post cosecha, en el tratamiento de aguas residuales, la industria cosmética, la industria alimenticia y en algunos tipos de plásticos biodegradables, entre otras (Figura 3.2).

En el área de cosméticos los polímeros derivados de la quitina encontraron mercado muy importante en productos de cuidado para el cabello y piel. Algunas compañías

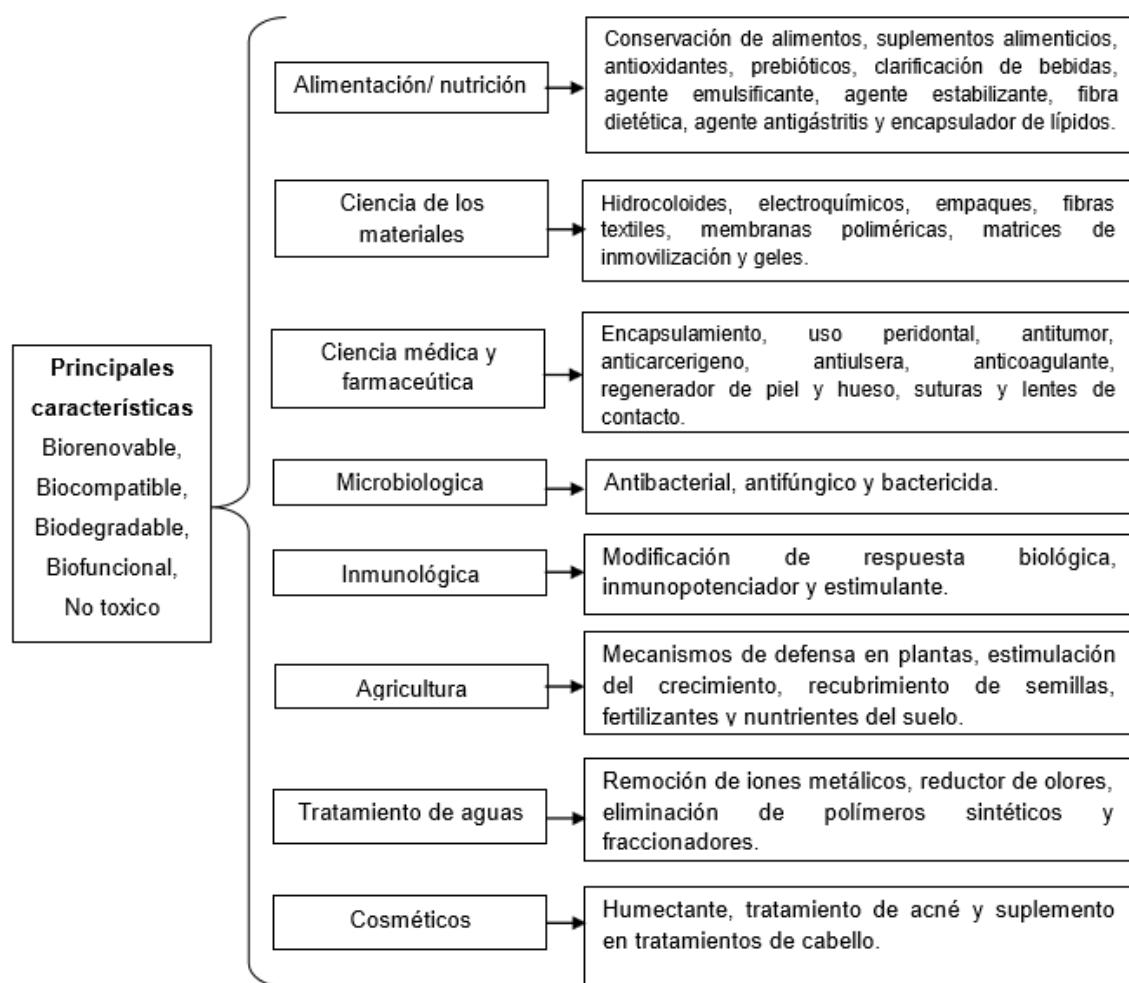
europas están usando el quitosano (derivado de la quitina) con este propósito (Peniche, 2006).

Así también, en la industria farmacéutica se emplea quitina en el proceso de inmovilización de enzimas y células microbianas ya que presenta mayores ventajas debido a las altas densidades celulares que pueden manejarse. En la industria de los alimentos, la quitina y sus derivados pueden usarse como fibra dietética, emulsificante, agente quelante, ingrediente acarreador no absorbible y humectante (Peniche, 2006).

En el tratamiento de agua es una de las áreas más importante debido a que la quitina es una sustancia amigable con el medio ambiente. Entre los principales usos en este campo se tiene el empleo como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alcalinidad, floculante para la remoción de partículas sólidas y pesticidas en soluciones acuosas (Peniche, 2006).

En la fabricación de papel se utiliza en el tratamiento de superficies y materiales fotográfico (Peniche, 2006).





*Figura 3.2 Principales aplicaciones de la quitina.  
Tomado del Esquema 1.1 de Pacheco-López, 2010, pp. 14.*

### 3.1.1 Fuentes de quitina

Actualmente, la principal fuente industrial de quitina es el exoesqueleto (caparazón) de los crustáceos (cangrejos, langostas, camarones y langostinos). En el caso del camarón y el cangrejo, la quitina representa el 14–27 % y 13–15 %, respectivamente. En las cutículas de los crustáceos, la quitina está íntimamente asociada con las proteínas, sales inorgánicas tales como el carbonato de calcio y lípidos incluyendo los pigmentos, así el aislamiento abarca varias etapas de purificación (Pacheco-López, 2010).

Pacheco-López (2010) también recopiló que las conchas de almejas y ostras contienen cantidades significativas de quitina; sin embargo, las producciones del polímero son bajas y el contenido de mineral es muy alto. Las conchas de almeja contienen de 4– 6% de quitina y un alto porcentaje de cenizas del 85 – 90%. En la

Tabla 3.2 se presenta la composición química de algunas fuentes de materia prima de quitina.

*Tabla 3.2 Composición química de algunas fuentes de materia prima para la obtención de quitina. Tomado de la Tabla 1.5 de Pacheco-López (2010), pp. 16.*

Origen	Composicion Quimica ( %)				
	Humedad	Proteinas	Cenizas	Lipidos	Quitina
Caparazones de jaiba y cangrejo					
• <b>Callinectes sapidus</b>	46.8	7	38.5	0.4	7.3
• <b>Paralithodes camtschaticus</b>	50	11	23	0.5	15.5
• <b>Chionectes opilio</b>	46.8	10.3	57.9	1.35	26.65
Camaron (langostino)					
<b>Penaeus spp</b>					
• <b>Cabeza</b>	77.04	12.9	5.2	2.06	2.8
• <b>Cascara</b>	65	22.1	9.2	0.5	6.2
Krill					
• <b>Euphasia superba</b>		41	23	11.6	24
Pluma de calamar					
• <b>Dosidicus gigans (calamar gigante)</b>	60	24.16	0.4	0.26	18.9
• <b>Loligo spp. (calamar comun)</b>	50	32.75	0.25		17

### 3.1.2 Método de obtención de la quitina

La quitina comercial se extrae a partir de desechos de crustáceos en la industria pesquera por medio del método químico, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta. Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente. La composición del material de partida varia notablemente de una especie a otra, tal como se muestra en la Tabla 3.2 (Peniche, 2006).

#### 3.1.2.1 Método Químico

En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, extracción de la proteína (desproteínización), eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización) y

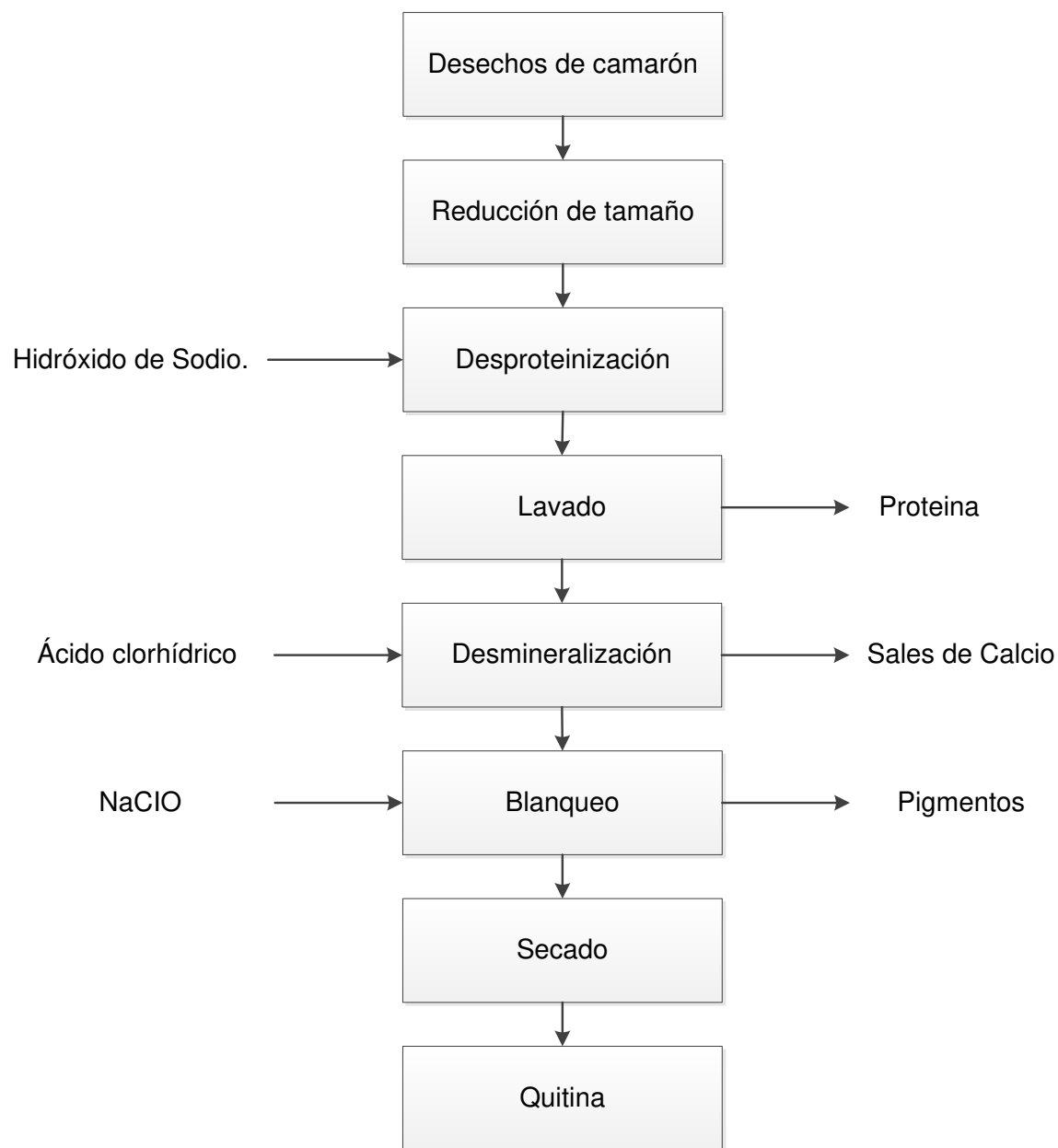
decoloración de la quitina obtenida, tal como se observa en el Diagrama de bloques de la Figura 3.3 (Peniche, 2006).

El acondicionamiento de la materia prima consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismo. Posteriormente se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros (Peniche, 2006).

En la desproteinización el procedimiento más comúnmente utilizado consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura altas (65-100°C), con el fin de disolver la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperatura muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial de polímero. También se han utilizado otros agentes para extraer la proteína, entre las cuales se mencionan las siguientes:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , KOH,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NH}_4\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  (Peniche, 2006).

También Peniche (2006) estudió que el principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el  $\text{CaCO}_3$  el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10 %) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento depende de la fuente, pero debe evitarse los tratamientos a temperaturas mas altas, que provocan la degradación del polímero, un tratamiento alternativo para disminuir la degradación que consiste en el empleo del agente acomplexante EDTA.

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la letuina y el  $\beta$ -caroteno. Los tratamientos anteriores (desproteinización y desmineralización) generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes, también se han empleado agentes oxidantes tradicionales como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 – 3%) y el NaClO (0.32%), aunque debe tenerse presente que estos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero (Peniche, 2006)



*Figura 3.3 Diagrama de bloques para la producción de quitina por el método químico Tomado de Peniche (2006).*

### 3.1.2.2 Método Biológico

Estudios bioquímicos y estructurales durante los ciclos de desarrollo de crustáceos de camarón sugieren la degradación de la quitina mediante diversas enzimas. Los productos obtenidos son recuperados y reutilizados, el carbonato de calcio es solubilizado y reabsorbido durante el mismo ciclo, esto mediante la acción de enzimas carbonic anhidrasa y algunas fosfatasas.

Debido a que es evidente la desmineralización, desproteinización e hidrólisis de la quitina en la naturaleza, diversos estudios se han enfocado en la utilización de métodos biológicos para la extracción de quitina como una alternativa al método químico (Pacheco-López, 2010).

### **3.1.2.3 Fermentación ácido láctica como método de extracción de quitina**

El uso de la fermentación ácido láctica para la extracción de quitina, recupera el biopolímero, resuelve problemas ambientales que se generan en el método químico por la producción de grandes cantidades de desechos tóxicos y recuperar compuesto de valor agregado como proteína.

Mediante la fermentación ácido láctica se obtiene un licor rico en proteínas que puede ser utilizado como suplemento alimenticio en las dietas de animales, así como minerales y pigmentos (Pacheco-López, 2010). En la Figura 3.4 se puede observar el Diagrama de bloques para la extracción de quitina propuesto por Marcia et. al (2011).

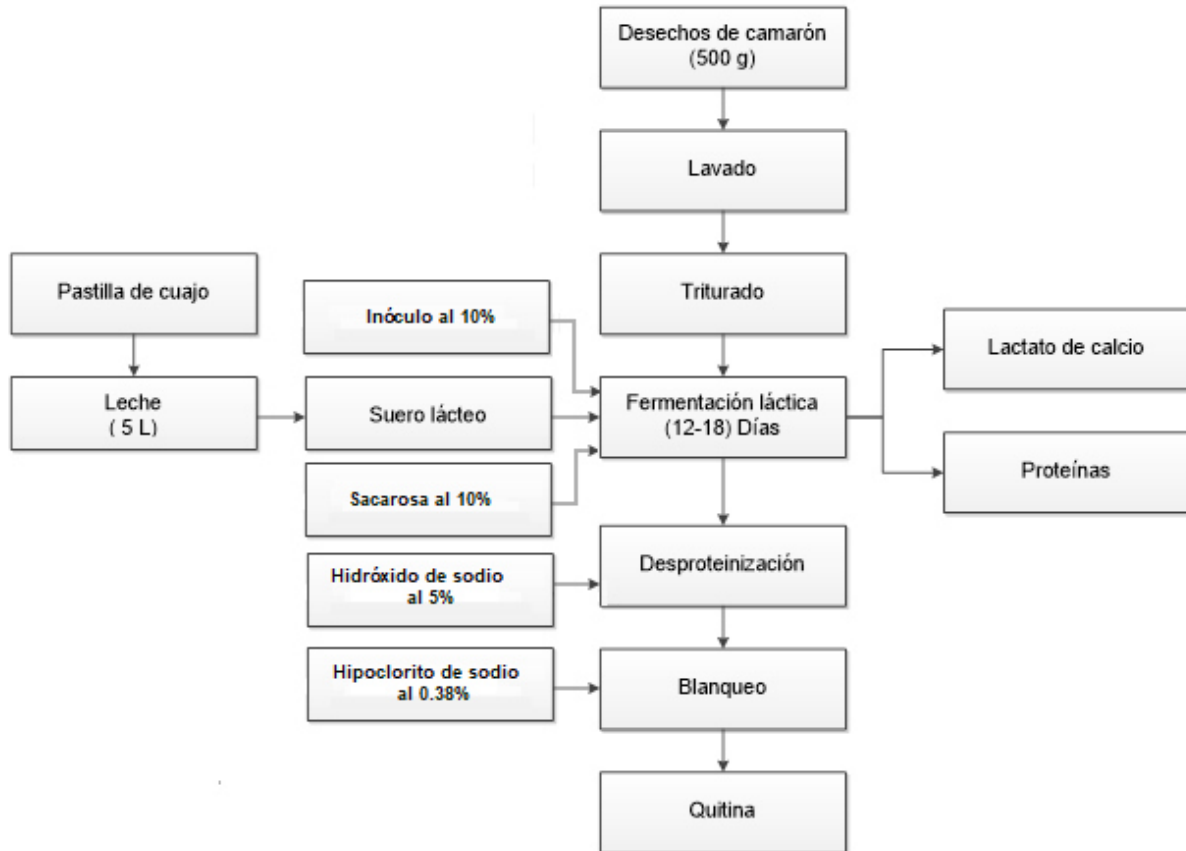


Figura 3.4 Diagrama de bloque de fermentación ácido láctica para la obtención de quitina. Adaptado de la Figura A.1 de Marcia et. al. (2011), pp. 72.

Las bacterias comúnmente utilizadas son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales producen ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ) a partir de una fuente de carbono adicionada al medio. Entre las fuentes de carbono que se han estudiado están la glucosa, la sacarosa, la lactosa, el suero de leche, entre otros. El ácido producido genera un descenso en el pH durante las primeras horas de fermentación lo que evita el crecimiento de microorganismo de descomposición.

El ácido láctico reacciona con el carbonato de calcio presente en el caparazón de camarón para producir lactato de calcio tal como se muestra en la Ecuación 3.1. El acetato de calcio se precipita y se remueve mediante lavados. Simultáneamente, las enzimas proteolíticas, producidas por el microorganismo presente en el desecho en combinación con la temperatura y el pH, llevan a cabo la desproteinización (Pacheco-López, 2010).



La eficiencia en la producción de ácido láctico durante la fermentación depende de diferentes factores tales como cantidad de inóculo, fuente de carbono, pH inicial y

durante la fermentación. En la Tabla 3.3 se muestran las diferentes fuentes de carbono utilizadas, dependiendo del tipo de microorganismo (Pacheco-López, 2010).

*Tabla 3.3 Principales microorganismos y su eficiencia en la extracción biológica de quitina. Tomado de la Tabla 1.6 de Pacheco-López (2010), pp. 21.*

Microorganismo	Fuente de desecho	Tiempo (h)	Fuente de carbono	Eficiencia	
				%Desm	%Desprot
Fermentación una etapa					
L. paracasei A3	Nephrops norvegicus	48	Glucosa	61	77.5
Lactobacillus	Camarón	28	Glucosa	90	86
L. paracasei A3	Procambarus clarkii	72	Dextrosa	97.2	94
L. pentosus 4023	Claekii	30	Suero de leche	90.1	94
Lactobacillus spp.B2	Peneaeus sp.	120	Sacarosa, Lactosa, suero de leche	87.6	85
L. Plantarum	Camarón	18	Glucosa	88	83
L. paracasei	Cangrejo	120	Glucosa	81	
P. acidolactici	Camarón	24-72	Glucosa	97,9	72.5
P. aeruginosa	Cangrejo	144	Glucosa	92	64
Fermentación en dos etapas (con fermentación, adición de dos microorganismos)					
L. paracaseii S. marcescens FS-3	Chionoectes japonicus	288	Glucosa	94.3	68.9
GM, L. casei MRS1	Cragon cragon	96	Glucosa	99.7	90.8
GM, L. casei MRS1	Penaeus monodon	110	Glucosa	99.6	97.4

%Desm= Porcentaje de desmineralización; %Desprot= Porcentaje de desproteínización.

### 3.1.2.4 Hidrólisis enzimática de proteínas

Las proteasas son hasta ahora el grupo más importantes de enzimas producidas comercialmente ya que se utilizan en diferentes áreas y aplicaciones, como detergentes, ablandadores de carne, fotografía, entre otros. Entre los microorganismos más estudiados en la producción de enzimas se encuentran *Bacillus spp*, *B. subtilis*, *B. firmus*.

Recientemente se ha estudiado el uso de enzimas proteolíticas como alternativa al método químico en la desproteínización de desechos de crustáceos. Utilizando este método, la proteína son recuperada en la forma de hidrolizados que puede ser incorporados como alimentos de acuicultura. Además, los hidrolizados recuperados puede ser fuente de péptidos biológicos activos con potenciales aplicaciones farmacéuticas, así como estimulantes de crecimiento en alimento de animales.

A pesar de que la hidrólisis enzimática no es capaz de remover el 100 % de proteínas, el contenido restante es fácilmente removido durante la producción

química del quitosano. Enzimas proteolíticas pertenecientes a *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentoseae* y *Aspergillus oryzae* han sido utilizadas para la desproteinización de desechos de camarón (Pacheco-López, 2010).

## 3.2 Fermentación Ácido Láctica

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta que produce compuestos orgánicos (Figura 3.5). Cuando la célula se encuentra en condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de generar moléculas de  $\text{NAD}^+$  que han sido reducidas durante la glucólisis para transformar la glucosa en ácido pirúvico y de esta manera continuar la reacción de producción de energía, por lo que es necesario reoxidar el  $\text{NADH}$  que cede sus electrones al ácido pirúvico y lo reduce a ácido láctico, ácido acético o etanol (Zakaria, Hally y Shama, 1997).

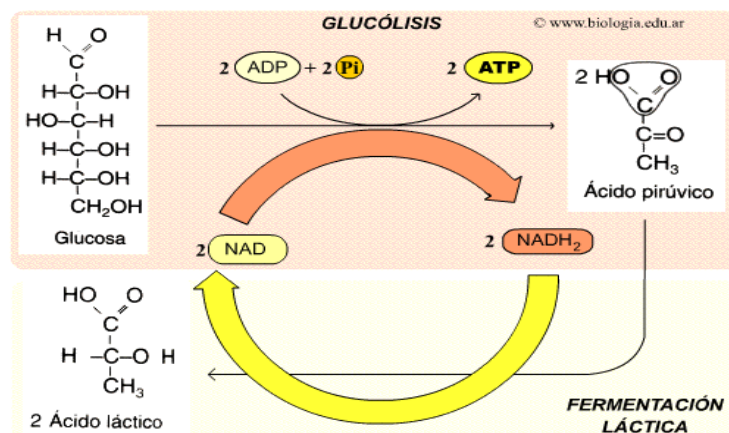


Figura 3.5 Diagrama del proceso de fermentación ácido láctica (Tomado de Bernal y Trujillo (2010). <http://larespiracioncelular.blogspot.com/2010/07/fermentacion-lactica-y-alcoholica.html>).

El proceso de fermentación donde el producto final es el ácido láctico (fermentación ácido láctica) se lleva a cabo por bacterias ácido lácticas (BAL), hongos, protozoos y en tejidos animales (Zakaria, Hally y Shama, 1997).

### 3.2.1 Bacteria ácido láctica (BAL)

Las BAL son un grupo de organismos en forma de cocos o bacilos, Gram-positivos, no esporulados, microaerófilos, los cuales producen ácido láctico como principal producto durante la fermentación de carbohidratos.

Están generalmente asociadas con ambientes ricos en carbohidratos, tales como diversos productos alimenticios (productos lácteos, carnes y vegetales fermentados,



frutas, ensilados y bebidas) pero algunas también son miembros de la flora normal del tracto intestinal, respiratorio y genital de humanos y animales. No requieren de oxígeno para crecer. Son resistentes a la inhibición por dióxido de carbono, nitritos y el humo. Son capaces de crecer a concentraciones relativamente altas de sal y pueden tolerar valores de pH más bajos que las bacterias Gram-negativas (Cira-Chávez, 2000).

### **3.2.2 Clasificación y géneros representativos de la bacterias**

El grupo de la BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros. Siendo los siguientes 12 los más representativos (Mora y García, 2007): *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*,

Los géneros que se describen a continuación son los de de mayor relevancia en la microbiología industrial (Mora y García, 2007).

#### **3.2.2.1 Lactobacillus**

Los lactobacillus tienen forma bacilar, variando desde bacilos largos y delgados (Figura 3.6) a cortos y curvados, no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), de requerimientos nutricionales complejos (Mora y García, 2007)

El género *Lactobacillus* es el más grande, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupos, basados principalmente en las características fermentativas. El grupo 1 incluye especies homofermentativas estrictas. El grupo 2 está formado por especies heterofermentativas facultativas. El grupo 3 está formado por especies heterofermentativas estrictas (Mora y García, 2007).

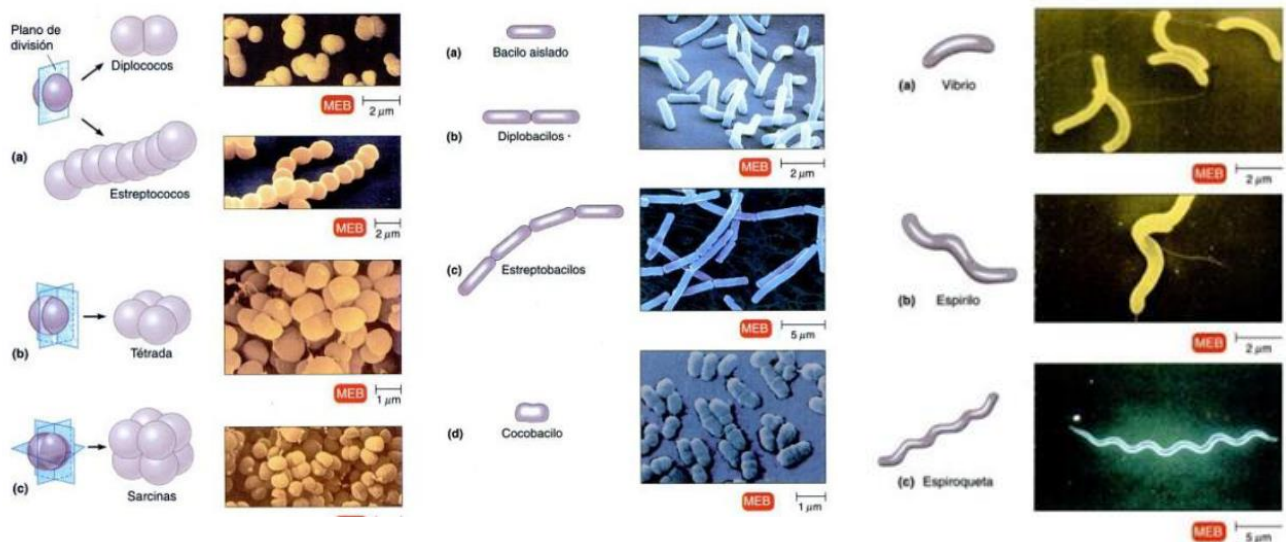


Figura 3.6 Algunos tipos de formas bacterianas (Adaptado de las figuras 4.1,4.2 y 4.4 de Introducción a la Microbiología, Tortora, Funke y Case, 2007,pp. 79).

### 3.2.2.2 Streptococcus

Son cocos de 0.8-1.2  $\mu\text{m}$  (Figura 3.6), anaerobios facultativos, se agrupan en cadena hasta con más de 50 células o pares. Tienen una compleja necesidad de factores para su crecimiento como: Vitamina B<sub>1</sub>, aminoácidos, péptidos, bases púricas y piridínicas (Mora y García, 2007)

### 3.2.2.3 Carnobacterium.

Son bacilos Gram positivos de 0.5-0.7x1.1-3.0  $\mu\text{m}$  (Tabla 3.4) aunque en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram. Son catalasa negativos, psicrótrofos creciendo la mayoría a 0°C, mientras que a 45°C no crecen, su metabolismo predominantemente homofermentativo. Algunas especies producen gas a partir de la glucosa. Se diferencia de los lactobacilos por ser incapaces de crecer en un medio con acetato y sintetizar ácido oleico. Se encuentran en carnes envasadas al vacío, en carne de aves de corral y en alimentos afines, así como también en pescado y agua del mar (Mora y García, 2007).

### 3.2.2.4 Pediococcus

Son cocos, Gram positivos (Tabla 3.4), catalasa negativos, anaerobios facultativos. Son homofermentativos, fermentan azúcares para producir una concentración de ácido, comprendida entre el 0.5 y 0.9 %, crecen en salmueras con una concentración

salina de hasta 5.5 %, mientras que su crecimiento es escaso en salmueras con concentraciones de hasta el 10 %. Sus temperaturas de crecimiento oscilan desde los 7 hasta los 45°C. aunque su temperatura óptima está entre 25 y 32°C.

Se presentan en parejas o en tetradas como consecuencia de la división celular en dos planos, el tamaño celular varía de 0.6 – 2 µm dependiendo de la especie. Raramente se observan células aisladas. En medios sólidos las colonias son de 1 – 2.5 mm de diámetro, lisas redondas y de color blanco grisáceo. Necesitan medios complejos para desarrollarse (Mora y García, 2007).

*Tabla 3.4 Fundamento de diferenciación entre Gram (+) y Gram (-). Suarez, 2008.*

Gram (+)	Gram (-)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>El peptidoglucano representa el 90% de la pared, aunque pequeñas cantidades de ácidos teicoicos suelen también ser parte de la misma.</b></li> <li>• <b>Algunos ácidos que contienen glicerol están unidos a los lípidos de la membrana denominados ácidos lipoteicoicos</b></li> <li>• <b>La adición al medio de una concentración adecuada de un soluto que no es capaz de penetrar en la célula, como la sacarosa, establece un desequilibrio entre la concentración del soluto en el exterior y el interior de la célula. Cuando, en estas condiciones, se compensa la presión de turgencia, la lisozima todavía es capaz de digerir el peptidoglicano, pero no causa la lisis y se forma un protoplasto</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El peptidoglucano constituye sólo alrededor del 10% de la pared, estando constituido el resto por una capa compleja.</li> <li>• Además del peptidoglicano, poseen una capa adicional en su pared que está compuesta de lipopolisacárido. Esta capa representa de hecho una segunda bicapa lipídica, si bien hay que decir que no consta solamente de fos-folípidos como la membrana plasmática, sino que contiene poli-sacáridos y proteínas. La presencia del lipopolisacárido justifica que la membrana externa se denomine generalmente capa de lipopolisacárido o simplemente LPS.</li> <li>• Forman esferoplastos que a diferencia de los protoplastos habitualmente existen porciones de pared unidas a la estructura que rodea a la membrana.</li> </ul>

### 3.2.2.5 *Lactococcus*

Son cocos no esporulados (Figura 3.6), inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento.

Antiguamente incluidos en el género *Streptococcus*, han sido elevados a la categoría de género, siendo admitidas las cuatro especies y tres subespecies siguiente:

- *Lc. Lactis* subesp. *Lactis*
- *Lc. Lactis* subesp. *Cremoris*.
- *Lc. Lactis* subesp. *Hordniae*
- *Lc. Garvieae*
- *Lc. Plantarum*
- *Lc. Raffinolactis*

Usualmente crecen en soluciones de NaCl al 4 % excepto *Lc. Lactis* subesp. *Cremoris* la cual únicamente tolera 2 % de NaCl (p/v). Se aíslan fácilmente de la leche cruda (*Lc. Cremoris*) y de otros hábitats, en particular de los vegetales (*Lc. Lactis* subesp. *Diacerylactis*), se encuentran también en la flora del rumen (10<sup>4</sup> células por gramo) (Mora y García, 2007).

### 3.2.2.6 *Leuconostoc*.

Son cocos Gram positivos (Tabla 3.4), catalasa negativos, anaerobios facultativos, pueden ser alargados o elípticos y dispuestos en pareja o cadenas, heterofermentativos, temperatura óptima de crecimiento de 20 a 30°C. Pueden aislarse de plantas, ensilados y leche. Muy utilizados en la industria láctea (en la manufactura del suero de la leche, mantequilla y queso) como cultivos iniciadores, ya que producen compuestos responsables del sabor como diacetilo o acetoina (productos de la ruptura metabólica del citrato) (Mora y García, 2007).

### 3.2.2.7 *Vagococcus*

Son móviles por medio de flagelos peritricos, gram positivos (Tabla 3.4), catalasa negativos y crecen a 10 pero no a 45°C. Se desarrollan en medios con una concentración de NaCl del 4%, pero no a 6.5 %, y a pH 9.6 no existe crecimiento. Se encuentran en heces, pescado, agua y otros alimentos (Mora y García, 2007).

### **3.2.3 Condiciones de crecimiento de las BAL**

El carbono es el nutriente más importante para el crecimiento de las bacterias lácticas seguido de nitrógeno el cual es requerido para la síntesis de aminoácidos, también son indispensables el fósforo, magnesio y elementos traza (Cira-Chávez, 2000).

La velocidad del proceso metabólico en las BAL varía en respuesta a las condiciones ambientales como el pH y la temperatura. La fermentación láctica es bastante sensible a la inhibición por producto, la enzimas reguladoras tiene una estabilidad limitada al pH y temperatura. Esto se debe a que son proteínas globulares, con enlaces no covalentes débiles y a medida que aumenta la temperatura o a pH extremos pierden actividad, convirtiendo a estos dos en parámetros importantes en el proceso (Cira-Chávez, 2000).

Generalmente, las BAL son mesófilas pero pueden crecer entre un intervalo de 5–45°C, con temperatura óptima que depende de la especie. Son tolerantes a condiciones ácidas y básicas lo que les permite crecer en intervalos pH entre 3.2 – 9.6 siendo el óptimo entre 5 – 7 (Cira-Chávez, 2000).

#### **3.2.3.1 Fuentes de Carbohidratos**

Debido a que los desechos de cangrejos son muy bajos en carbohidratos libres, es necesario adicionarlos a fin de lograr una buena producción de ácidos. Mientras las bacterias ácido lácticas requieren carbohidratos fermentables para ser capaces de crecer, algunas son capaces de generar energía a partir de aminoácidos tales como la L-arginina en presencia de pequeñas cantidades de glucosa (Juárez-Castelán, 2010).

#### **3.2.3.2 Factores orgánicos de crecimiento**

Las vitaminas, aminoácidos y otros factores orgánicos de crecimiento son requeridos para el crecimiento de las bacterias lácticas derivadas a partir de los tejidos del pescado y están aparentemente en cantidades adecuadas (Cira-Chávez, 2000).

#### **3.2.3.3 Condiciones anaeróbicas**

La eliminación del oxígeno es un factor importante en la reducción del crecimiento de microorganismos aerobios obligados durante las etapas iniciales de la fermentación, antes de que las condiciones ácidas sean establecidas.

El mantenimiento de las condiciones anaerobias especialmente en la superficie del producto final de la fermentación, es necesario para excluir el crecimiento de hongos

y levaduras, ya que estos son capaces de tolerar las condiciones ácidas y su crecimiento puede dirigirse al agotamiento de los ácidos orgánicos y consecuentemente al aumento del pH, con serias implicaciones para el mantenimiento de la calidad y seguridad del producto (Owens, 2005).

#### **3.2.3.4 Temperatura**

La temperatura puede tener una considerable influencia sobre la composición de las poblaciones microbianas. Ciertamente, las altas temperaturas ambientales promueven el rápido crecimiento de todas las clases de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos y de descomposición, así como las bacterias ácidas lácticas (Cira-Chávez, 2000).

#### **3.2.3.5 Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH**

El crecimiento de bacterias lácticas esta necesariamente acompañado por la secreción de ácido láctico y en algunas circunstancias, de ácido acético y una consecuencia disminución del pH en el medio. De ahí, que las bacterias lácticas sean excepcionalmente tolerantes entre las bacterias, a bajos valores de pH en presencia de ácidos orgánicos débiles, azúcar y ambientes ricos en nutrientes.

La toxicidad de los ácidos débiles esta relacionada con la concentración de moléculas del ácido no dissociado, la cual es una función de la concentración total del ácido, su pKa y el valor de pH del sistema. Para una efectiva inhibición de las bacterias patógenas y de descomposición, es importante que el valor de pH en la fermentación disminuya tan rápido como sea posible a niveles en los cuales una proporción significativa del ácido esta presente en forma no dissociada. Como el ácido láctico tiene un pKa de 3.87, la inhibición será importante a valores de pH por debajo de 4.9 (Owens, 2005).

#### **3.2.3.6 Concentración de dióxido de carbono**

Se ha sugerido que la tolerancia a altas concentraciones de dióxido de carbono es un factor decisivo para la proliferación de las bacterias lácticas. La mayoría de las otras bacterias son sustancialmente menos tolerantes. De esta manera, la producción temprana de dióxido de carbono en la fermentación puede ser un factor en la rápida supresión de las bacterias patógenas y de descomposición (Owens, 2005).

### **3.2.3.7 Capacidad amortiguadora del sustrato**

La conservación de alimentos por fermentación láctica depende del rápido establecimiento de las condiciones ácidas de tal manera que los organismos de descomposición no tenga tiempo de crecer significativamente (Owens, 2005).

Los alimentos con baja capacidad amortiguadora, tales como la mayoría de los vegetales tendrán valores de pH bajos más rápidamente por una cantidad relativamente pequeña de crecimiento y producción de ácido. Los alimentos proteicos, con mucho más capacidad amortiguadora, requerirán mucho más cantidad de crecimiento y producción de ácido para presentar la misma caída en el valor de pH (Cira-Chávez, 2000).

### **3.2.4 Número inicial de bacterias lácticas**

Las fermentaciones tradicionales dependen de los microorganismos que se encuentran naturalmente en el sustrato o en un equipo de preparación como una fuente de inóculo, seguido por la provisión de condiciones adecuadas para la proliferación del tipo deseado. La inoculación de un gran número del tipo deseado de bacterias lácticas y de la fuente de carbono asegurará una rápida acidificación.

### **3.2.5 Productos de fermentación ácido láctica**

Las fermentaciones ácido lácticas cuando son realizadas se producen metabolitos como el ácido láctico, etanol, bacteriocinas y muchos otros compuestos que conservan los alimentos y le imparten características organolépticas distintivas.

#### **3.2.5.1 Ácidos Orgánicos**

El principal producto de la fermentación de las BAL es el ácido láctico, el cual es primariamente responsable de la disminución del pH. Además del ácido láctico, otros ácidos orgánicos también son formados, por ejemplo, ácido acético, fórmico y succínico. Las cantidades de ácidos débiles producidos reducen el pH del medio considerablemente e inhiben o reducen el crecimiento de muchas bacterias, incluyendo aquellas que causan descomposición de los alimentos y los patógenos (Herrera, 2009).

### **3.2.5.2 Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno es generado por diferentes mecanismos durante el crecimiento de lactobacilos. Muchos microorganismos incluyendo a las bacterias lácticas, producen peróxido de hidrógeno como un mecanismo de protección contra los efectos tóxicos del oxígeno. El peróxido es un efectivo agente antimicrobiano en virtud de ser un potente oxidante.

Se cree que el efecto inhibitorio es debido a la formación de radicales hidroxilos los cuales son muy activos. Estos compuestos reaccionan con los componentes esenciales de las células ocasionándole daños (Juárez-Castelán, 2010).

### **3.2.5.3 Diacetilo**

La fermentación del citrato produce diacetilo (2,3 butadieno), el cual confiere un sabor a mantequilla en ciertos productos. Este compuesto es conocido por su capacidad inhibitoria, reporta que 200 µg/ml de diacetilo inhiben a levaduras y bacteria Gram-negativas (Herrera, 2009).

### **3.2.5.4 Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son proteínas producidas bacteriológicamente que tienen un efecto letal sobre otras bacterias, que a menudo están relacionadas cercanamente. Se han encontrado que las BAL producen una variedad de tales compuestos, muchos de los cuales han sido aislados y caracterizados (Herrera, 2009).

## **3.3 Aislamiento de bacterias ácidos lácticas.**

Actualmente se dispone de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias ácidos lácticas (Tabla 3.5), aunque sólo algunos de ellos son selectivos (Suarez, 2008).

La capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas (catalasa, oxidasa y coloración de gram) y bioproductos (ácido acético, diacetilo, acetoína, gas carbónico, etc.) de las especies a aislar. Los medios de cultivo más utilizados para aislar bacterias lácticas son: el M17 para *lactococcus spp*; MRS para *lactobacillus spp* y el MSE para *leuconostoc spp*.



*Tabla 3.5 Medios de cultivos para aislar bacterias ácido-lácticas. Suarez, 2008.*

Microorganismos	Agar
<b>Lactobacillus spp.</b>	MRS
<b>Lactococcus spp.</b>	M 17
<b>Leuconostoc spp.</b>	MSE
<b>Leuconostoc</b>	APT

### **3.3.1 Catalasa**

Se basa en la capacidad que tienen los microorganismo catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos fresco almacenado en refrigeración (Suarez, 2008).

### **3.3.2 Oxidasa**

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativo y excepcionalmente en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa (Suarez, 2008).

### **3.3.3 Tinción de Gram.**

Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en gram positivas y gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol, se dejan colorear con la fucsina o safranina, quedando de color rosado (Suarez, 2008).

## 3.4 Métodos de identificación microbiana

Para el análisis de bacterias ácido lácticas se recurren a la determinación de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, que permiten establecer la identidad de un microorganismo.

### 3.4.1 Métodos Fenotípicos

Los métodos tradicionales de identificación se basan en el estudio de aspectos fenotípicos y fisiológicos de la población. Por lo general, la identificación comienza con el examen morfológico de las colonias aisladas en medios sólidos.

El estudio continúa con el examen microscópico de un extendido de los microorganismo aislados, coloreados según la técnica de Gram. A partir de aquí se inoculan las pruebas bioquímicas tradicionales, donde se requieren cultivos puros del microorganismo en cuestión para obtener una biomasa suficiente capaz de evidenciar los cambios en las pruebas utilizadas como son: sistema indicadores de pH, formación o degradación de determinadas sustancias y actividades enzimáticas (García, 2007).

La identificación fenotípica a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas:

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37, 45 °C)
- Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2, 4, 6.5 %)
- Sobrevivencia al tratamiento térmico (63 y 65 %)
- Fermentación de carbohidratos, principalmente: fructosa, glucosa, galactosa, arabinosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, rafinosa, manosa, xilosa, dextrosa, amigdelina, celobiosa, melectiosa, melibiosa, ribosa, salicina, sorbitol y sacarosa.
- Producción de acetoina.
- Hidrólisis de esculina.

### 3.4.2 Micrométodos

Los métodos microbiológicos tradicionales son laboriosos y lentos, esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos, fiables y menos costosos para detectar e indentificar microorganismos. A través de los años, han comenzado a utilizarse sistemas miniaturizados de identificación que consisten en galerías con sustratos para evidenciar en forma clara una determinada actividad metabólica.

Todos los micrométodos de identificación comerciales están basados en una de cinco tecnologías diferentes o una combinación de ellas. Estos incluyen, reacciones para identificar cambios de pH que requieren de 15 a 24 h de incubación; evidenciar

reacciones enzimáticas que requieren de 2 a 4 h: identificar fuentes de carbono, detección visual de crecimiento bacterial, o a la detección de ácidos grasos vía cromatografía de gas.

Estos métodos presentan tres ventajas importantes frente a las técnicas convencionales; posibilidad de determinar varias actividades enzimáticas en periodos de tiempo breves, fácil de realizar y manejar, además de requerir menos material y equipamiento. Actualmente existen diversos sistemas miniaturizados de diagnóstico; de entre ellos cabe mencionar los siguientes (García, 2007):

- **API (bioMérieux, Inc, Francia):** Es un sistema estandarizado para la identificación de diferentes grupos bacterianos. Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de varias pruebas bioquímicas a partir de una única suspensión.
- **Biolog (Biolog, Inc. EE UU):** Este método determina la capacidad de una bacteria de metabolizar 95 diversas fuentes de carbono que incluyen aminoácidos, ácidos carboxílicos e hidratos de carbono, también mide el grado de actividad de enzimas específicas (deshidrogenasas) que reducen las sales de tetrazolio usadas como indicadores redox; esto se hace para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones. Una prueba positiva, se da por la reducción de una sal de tetrazolio, que causa la formación de un precipitado de coloración rojiza intensa, conocida como formazán.
- **BBL Cristal (Becton Dickinson & Co, EEUU):** Es un método miniaturizado para la identificación de microorganismos que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Los paneles del sistema contienen sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los sustratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los sustratos fluorogénicos que contienen los microtubos, resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista con una lámpara de luz ultravioleta. Los sustratos cromogénicos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente.
- **ATB (bioMérieux):** Galería con 2 sustratos para la identificación de microorganismos anaerobios, Estafilococos, Micrococos, levaduras, enterobacterias, Streptococos y bacilos gram negativos.

### **3.4.2.1 Sistema API 50 CH**

Es un sistema estandarizado, que asocia 49 pruebas bioquímicas para estudiar el metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. API 50 CH, es usado para la identificación de lactobacillus y géneros relacionados. Este método consiste en una plantilla con 50 microtubos con los sustratos que serán fermentados por cierto microorganismo; los sustratos son, en su mayoría, carbohidratos o derivados. Las pruebas de fermentación son inoculadas con medio API 50 CHL de composición similar al caldo MRS pero sin glucosa, citrato de amonio y con púrpura de bromocresol o con medio API 50 CHB/E, que rehidratan los sustratos (García, 2007).

Durante la incubación, la fermentación es evidenciada por un cambio en el color del microtubo, causada por la producción anaerobia de ácido que origina el vire del indicador de pH en el medio. El primer microtubo, que no contiene ningún ingrediente activo, es usado como un control negativo. El medio empleado en la inoculación de las plantillas dependerá del metabolismo y las exigencias nutricionales del grupo microbiano a ser probado.

El API 50 CH es usado para observar dos actividades metabólicas: La oxidación que es visible por un cambio en el color del cultivo, causada por la producción de ácido y el vire del indicador pH en el medio escogido y la asimilación que es evidenciada por el crecimiento del organismo en el porcillo cuando el sustrato es usado como la única fuente disponible de carbono (García, 2007).

### **3.4.3 Métodos Genotípicos**

Existen técnicas de clasificación de microorganismos basadas en el ADN con la que es posible distinguir microorganismos a nivel de especie y cepa. En los últimos años las técnicas moleculares han cambiado la perspectiva de la diversidad microbiana y permitirán describir, monitorear y controlar comunidades microbianas para que lleven a cabo las actividades requeridas, es posible obtener mediante el uso de métodos moleculares datos confiables sobre la diversidad y la identificación taxonómica de los microorganismos (García, 2007).

La taxonomía de BAL basado en análisis genéticos ha revelado que algunos resultados generados por métodos fenotípicos no corresponden con las relaciones filogenéticas. Técnica moleculares, sobre todo métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como rep-PCR y análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) así como la electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE), son considerados métodos importantes para la caracterización específica y la detección de especies de BAL (García, 2007).

## 3.5 Proteínas

Las proteínas son los constituyentes más importantes de la materia viva y uno de los alimentos básicos y esenciales del hombre y del mundo animal. Las proteínas pueden definirse como macromoléculas complejas de alto peso molecular que por hidrólisis completa rinden aminoácidos o compuestos similares (Zumbado, 2004).

Las proteínas son elementos fundamentales para la vida animal y vegetal desarrollando importantísimas y muy variadas funciones biológicas. Forman parte de los tejidos, de las hormonas, de los anticuerpos, de las enzimas y son además componentes principalísimos de la sangre transportando grasas al torrente sanguíneo y oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos (Zumbado, 2004).

Otro elemento esencial a tener en cuenta a la hora de valorar la importancia de la determinación de proteínas en los alimentos es la influencia que éstas tienen en las propiedades físico-químicas y tecnológicas de los alimentos (Zumbado, 2004).

Por otra parte, las proteínas se encuentran frecuentemente combinadas física y químicamente con carbohidratos (glucoproteínas) y lípidos (lipoproteínas), los cuales influyen en las propiedades reológicas de los alimentos y materias primas, desempeñando un importante papel en la preparación de emulsiones comestibles (Zumbado, 2004).

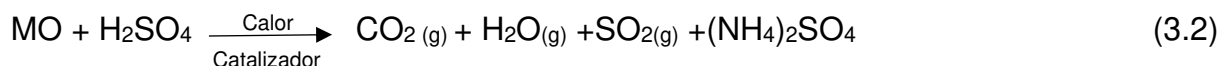
### 3.5.1 Determinación de proteínas totales por el método Kjeldahl

El nitrógeno es el elemento químico más sobresaliente que se encuentra en las proteínas y a pesar de esto, no todo el nitrógeno de la materia orgánica proviene necesariamente de las proteínas, los métodos de determinación de proteínas totales usados hoy en día se fundamentan en la cuantificación de nitrógeno total (Zumbado, 2004).

Los fundamentos de cada una de las etapas se describen a continuación (Zumbado, 2004):

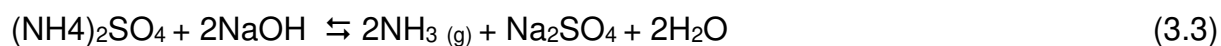
#### 3.5.1.1 Digestión

Se emplea ácido sulfúrico concentrado y sulfato de cobre como catalizador, los cuales con ayuda de calor y sulfato de potasio oxidan la materia orgánica (MO) hasta  $\text{CO}_2$  y agua, y transforman todo el nitrógeno amínico ( $\text{NH}_2$ ) e imínico ( $\text{NH}=\text{NH}$ ) provenientes de proteínas y aminoácidos en ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La reacción general es:



### 3.5.1.2 Destilación

La muestra digerida se trata con un álcali (NaOH 40% m/v) añadido en exceso, el cual reacciona descomponiendo el sulfato de amonio en amoníaco, que es volátil y se destila por arrastre con vapor (Zumbado, 2004). La reacción que tiene lugar es la siguiente:



El amoníaco destilado se recoge en un matraz erlemeyer con una mezcla de indicadores (bromocresol verde-rojo de metilo) y solución alcohólica de ácido bórico (Zumbado, 2004), ocurriendo la siguiente reacción:



### 3.5.1.3 Valoración

El borato de amonio formado se valora entonces utilizando una solución estandarizada de ácido clorhídrico como patrón valorante, según (Zumbado, 2004):



El punto final de la valoración estará a pH ácido, por la presencia de ácido bórico formado.

El contenido de nitrógeno finalmente calculado se multiplica por un factor característico de cada alimento y se obtiene entonces el contenido de proteínas totales (Zumbado, 2004).

**Tabla 3.6** Principales factores de conversión. Zumbado, 2004.

Alimento	Factor de conversión de Nitrógeno a proteínas
<b>Productos cárnicos</b>	6.25
<b>Huevos</b>	6.68
<b>Productos lácteos</b>	6.38
<b>Soya</b>	6.00
<b>Cereales</b>	5.95

### 3.5.2 Reacción xantoproteica

Los aminoácidos tienen un papel primordial en la formación de los seres vivos, puesto que constituyen los bloques fundamentales con que se forman las proteínas.

Los anillos aromáticos presentes en algunos aminoácidos reaccionan con ácido nítrico concentrado formando nitroderivados de color amarillo o anaranjado por lo cual esta reacción permite reconocer la presencia de Tirosina, Fenilalanina y Triptófano como prueba cualitativa.

## 3.6 Espectroscopia infrarroja

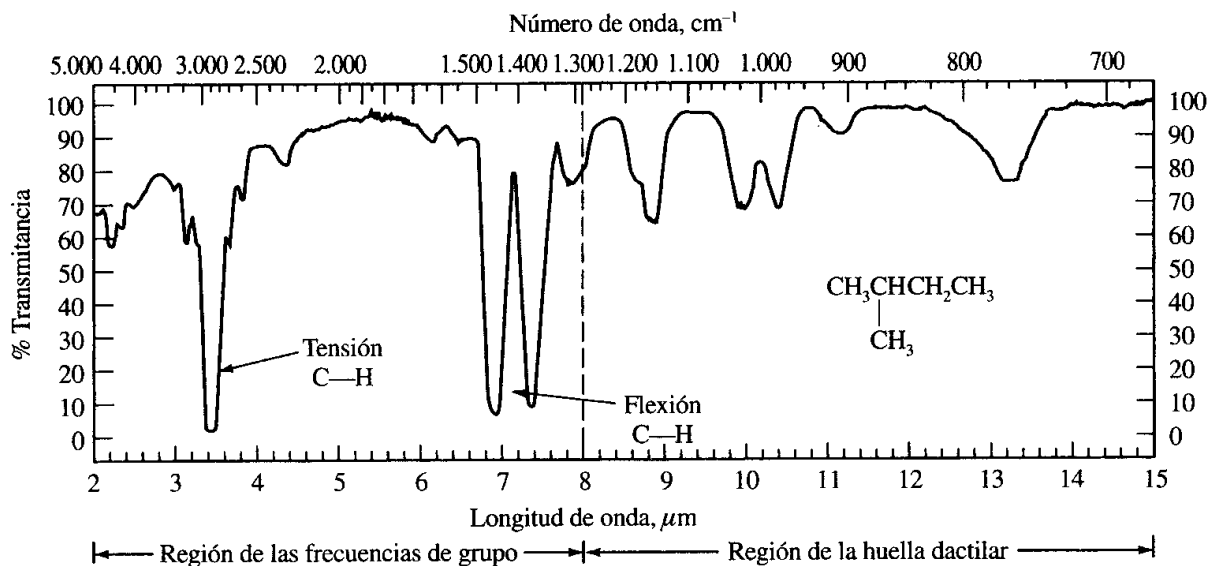
Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros (Skoog, Holler y Niemann, 2001).

La espectrometría de absorción y reflexión en el infrarrojo medio es la principal herramienta para la determinación estructural de especies orgánicas y bioquímicas (Skoog, Holler y Niemann, 2001).

La identificación de un compuesto químico a partir de un espectro de absorción es un proceso que consta de dos etapas. La primera etapa implica la determinación de grupos funcionales, que parecen más probables que estén presentes, examinando la región de frecuencias del grupo que abarca la radiación comprendida de  $3600\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente (Figura 3.7).

La segunda etapa consiste en una comparación detallada del espectro del compuesto desconocido con los espectros de compuestos puros que contienen todos los grupos funcionales encontrados en la primera etapa.

En este caso es particularmente útil la región de huella dactilar comprendida entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3.7) debido a que pequeñas diferencias en la estructura y constitución de una molécula provocan cambios significativos en el aspecto y distribución de los picos en esta región. Como consecuencia un gran parecido en la región de huella dactilar (así como en las otras) de los espectros de dos compuestos constituye casi una evidencia de su identidad (Skoog, Holler y Niemann, 2001).

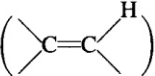


**Figura 3.7** Regiones de frecuencias de grupo y de la huella dactilar (Skoog, Holler y Niemann, 2001).

En la Tabla 3.7 se pueden observar las frecuencias de los principales grupos orgánicos.



**Tabla 3.7** Abreviada de las frecuencias de grupos orgánicos. Skoog, Holler y Niemann, 2001.

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias, $\text{cm}^{-1}$	Intensidad
C—H	Alcanos	2.850-2.970 1.340-1.470	Fuerte Fuerte
C—H	Alquenos 	3.010-3.095 675-995	Media Fuerte
C—H	Alquinos ( $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ )	330	Fuerte
C—H	Anillos aromáticos	3.010-3.100 690-900	Media Fuerte
O—H	Alcoholes y fenoles (monómeros)	3.590-3.650	Variable
	Alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3.200-3.600	Variable, a veces ancha
	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3.500-3.650	Media
	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2.500-2.700	Ancha
N—H	Aminas, amidas	3.300-3.500	Media
C=C	Alquenos	1.610-1.680	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1.500-1.600	Variable
C≡C	Alquinos	2.100-2.260	Variable
C—N	Aminas, amidas	1.180-1.360	Fuerte
C≡N	Nitrilos	2.210-2.280	Fuerte
C—O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1.050-1.300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1.690-1.760	Fuerte
NO <sub>2</sub>	Nitroderivados	1.500-1.570 1.300-1.370	Fuerte Fuerte

## 4. METODOLOGÍA

En esta sección se presenta la metodología desarrollada, describiendo la parte experimental de la investigación, el enfoque, las técnicas y procedimientos utilizados para cumplir con los objetivos del estudio.

### 4.1 Universo

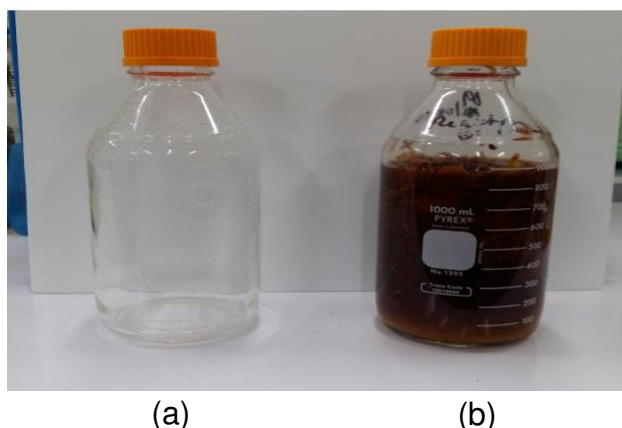
En la industria alimenticia de procesamiento del camarón no se aprovecha totalmente el producto capturado. Aunque el residuo depende del tipo de producto a comercializar, se identifican como desechos el cefalotórax y patas, antenas, colas entre otros.

### 4.2 Materiales

- a. **Desechos de camarón (Caparazón):** compuesto por cola, patas y cefalotórax, lo cual constituye aproximadamente el 50 % del camarón rojo, especie *Farfantepenaeus brevisrostris* según Rivera (2008). El material fue proporcionado por la Empresa Camaronera Nica Fish ubicada en km 16 carretera norte, Managua.
- b. **Suero lácteo:** es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína. El suero lácteo sin sal usado para preparar el reactor madre, se compró en Quesillos Salome ubicado en Tipitapa, carretera Masaya, y el suero lácteo usado en los experimentos de fermentación láctica se compró en Belén, Rivas a quesería familiar ubicada en km 84 ½ Carretera Panamericana Sur. A las muestras de suero se le verificó su pH al inicio de cada fermentación, presentando un pH en un rango entre 3.60 y 4.07, con un pH promedio de 3.83.
- c. **Melaza:** es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña. La melaza utilizada como fuente de carbono en los experimentos fue adquirida en el Ingenio Montelimar. Este producto presentaba un contenido de sólidos disueltos de 78°Bx.
- d. **Azúcar Sulfitada comercial (Sacarosa):** es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, que se obtiene principalmente de la caña de azúcar. El material se adquirió en el mercado local.
- e. **Inóculo:** Se obtuvo de la fermentación de desechos de camarón triturados con un tamaño de partícula mayor a 3.35 mm (Tabla A.16). El proceso se llevó a cabo

en un reactor de pírex con capacidad de 4 L (Reactor Madre), el cual se alimentó con melaza y lactosuero para inducir el crecimiento de bacterias. El montaje del reactor madre se describe en el inciso 4.4.1.

- f. **Reactor Madre:** Se usó para la preparación de inóculo un reactor que consiste en un cilindro vertical de vidrio Pyrex de 55 cm de largo por 16 cm de diámetro para un volumen total de cuatro litros, y una canastilla cilíndrica de acero inoxidable concéntrica de 30.5 cm de largo por 10.5 cm de diámetro.
- g. **Frascos de vidrio tipo schott (Frascos de fermentación):** se usaron para la fermentación láctica de acuerdo al diseño de experimentos mostrado en la Tabla A.5 del Anexo V. Los frascos con tapa, resistente a autoclave tienen una capacidad de 1 litro, una altura de 20.3 cm y un diámetro de 8.2 cm (Figura 4.1).



**Figura 4.1** (a) Reactor de un frasco de vidrio tipo schott con tapa, de autoclave +120°C, y (b) reactor en el proceso de fermentación de caparazón de camarón y suero lácteo enriquecido.

- h. **Cristalería:** La cristalería para la inoculación de los experimentos y el procedimiento de identificación de bacterias se esterilizaba por vía húmeda (autoclave) o seca (horno). Para la toma de muestras se utilizaron beakers de 50 ml esterilizados en un horno.
- i. **Medio MRS:** Se usó agar MRS como medio para el aislamiento de las bacterias ya que facilita solo el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Para su preparación, se disolvieron 68.2 g del medio en 1 litro de agua desmineralizada caliente con agitación constante. Posteriormente, la mezcla se introdujo en una autoclave durante 15 minutos a 121°C. El pH se verificó, asegurando que estuviera entre 5.6 a 5.9 a 25°C.
- j. **Agua peptonada:** fue el medio utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Este se usó como diluyente en las diluciones de la muestra líquida tomada del Experimento No. 4, para la determinación de la concentración de bacterias ácido lácticas.

## 4.3 Operación de variables

En la Tabla 4.1 se especifican las variables, indicadores, metodología e instrumentos/equipos a utilizar para cumplir con los objetivos específicos del trabajo monográfico.

**Tabla 4.1** Tabla de operación de las variables.

Objetivos específicos	Variables	Indicadores	Método/Instrumento
<b>Determinar el efecto del tamaño de partícula, concentración de inóculo y tipo de sustrato en el rendimiento y calidad de la quitina obtenida por fermentación ácido-láctica del caparazón de camarón rojo, <i>Farfantepenaeus brevis</i>.</b>	Tamaño de partícula	Grado de correlación de la quitina	Procesador de alimentos,
	(menor a 3.35 mm)	(Calidad de la quitina)	Licuada, Tamices,
	Concentración de inóculo (5 y 10% v/v)	Porcentaje de rendimiento de ambos productos	Espectrofotómetro Alpha FTIR – Bruker
	Tipo de sustrato (Azúcar y Melaza)		
<b>Evaluar el comportamiento del proceso de fermentación ácido láctica a través de pH y acidez total titulable.</b>	Tamaño de partícula	pH,	Métodos potenciométricos y volumétricos de análisis,
	Concentración de inóculo	Porcentaje de Acidez Total Titulable (ATT)	pH-metro,
	Tipo de sustrato		
<b>Caracterizar las bacterias ácido lácticas presentes en el proceso de fermentación por medio de la tinción de Gram y las pruebas de Catalasa, Oxidasa y de motilidad, para su identificación usando el sistema API 50 CH en conjunto con el médium API 50 CHL,</b>	Tamaño de partícula	Cepas aisladas	Micro métodos: API 50CH en conjunto con el médium API 50 CHL Tinción de Gram y las pruebas de Catalasa, Oxidasa y de motilidad
	(menor a 3.35 mm)		
	Concentración de inóculo: 10% v/v		
	Tipo de sustrato: Azúcar		

## **4.4 PROCEDIMIENTO**

### **4.4.1 Desarrollo de Inóculo. Reactor Madre**

El inóculo se preparó con una cantidad poblacional de microorganismos (BAL), los cuales se desarrollaron en una corrida preliminar en el Reactor Madre. Para ello:

- a. Se descongelaron los desechos de camarón y posteriormente, se trituró en un procesador de alimentos por un tiempo de 2 minutos.
- b. Se pesaron 500 g de caparazón de crustáceo en una balanza de precisión, y se depositaron en la canastilla del Reactor Madre. Posteriormente, se adicionó el suero lácteo enriquecido con melaza al 10% p/v, del volumen total de 4 L, ocupando alrededor del 75% del reactor.
- c. La fermentación batch se llevó a cabo por un período de dos semanas a temperatura ambiente (aproximadamente  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Para valorar el comportamiento de las bacterias ante el consumo de proteínas y minerales que posee los desechos de camarón, se tomaron alícuotas de 20 ml en intervalos de 24 o 48 horas de iniciado el experimento. Los análisis que se realizaron al licor fueron: Porcentaje de Acidez total titulable (ATT) y pH. Los métodos para determinar estos parámetros se describen en los ítems A.1.1 y A.1.2 del Anexo I.
- d. Concluido el proceso de fermentación, se separó la quitina cruda (contenida en la canastilla) del líquido residual (inóculo), el cual está conformado por lípidos, ácido láctico, lactato de calcio, bacterias, azúcares, etc.
- e. El inóculo fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 2000 ml y se refrigeró para su preservación.

### **4.4.2 Preparación de la materia prima**

- a. La muestra de caparazón de camarón se descongeló completamente y se lavó para eliminar suciedades y desechos de carne.
- b. El material se trituró en un procesador de alimentos (mayor tamaño de partícula) o una licuadora (menor tamaño de partícula). La trituración en el procesador se realizó a velocidad media durante 2 minutos; mientras que la trituración en la licuadora se realizó junto al suero lácteo para facilitar la interacción con las cuchillas. El propósito de la trituración fue conseguir el tamaño de material adecuado para promover la interacción entre las bacterias y el caparazón. Así como también, debilitar la estructura del caparazón y facilitar la separación de la quitina y la proteína.

- c. El rango de tamaño del triturado del desecho de camarón resultante de cada equipo fue determinado mediante un análisis de tamizado húmedo. La descripción del procedimiento se muestra en el ítem A.2.4 del Anexo II.
- d. Así también, se tomó una muestra de desecho de camarón para determinar el contenido de humedad presente (Tabla A.15 del Anexo A.VI), usando el procedimiento descrito en el ítem A.2.3, del Anexo II.

#### **4.4.3 Proceso de Fermentación Láctica**

- a. Se pesaron, en una balanza de precisión, 125 g de los desechos previamente triturados a diferentes tamaños (de acuerdo al diseño de experimentos) con un porcentaje de humedad promedio del 41.5%.
- b. Los desechos fueron depositados en el frasco de fermentación junto con el suero lácteo (562.5 ml), el cual estaba enriquecido con el sustrato (azúcar o melaza) al 10% p/v y el inóculo, ocupando alrededor del 75% del frasco.
- c. Para inocular cada uno de los 24 experimentos se tomaron alícuotas de 100 ml y 50 ml que representan, el 10% y 5% de volumen de fermentación para los reactores de 1 L, procurando asegurar la estabilización de los residuos y la prevención de la colonización de organismos de descomposición a como lo sugiere Zakaria (1998).
- d. La fermentación batch se llevó a cabo por un período de dos semanas a temperatura ambiente (aproximadamente  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Durante este tiempo, el reactor se agitó por un periodo de 3 minutos, cada 12 o 24 horas.
- e. Para valorar el comportamiento de las bacterias ante el consumo de proteínas y minerales contenidos en los desechos de camarón, se tomaron alícuotas de 20 ml en intervalos de 24 h (o 48 h) de iniciado el experimento, a las cuales se les realizó análisis de pH y ATT.
- f. Concluido el proceso de fermentación, se separó la quitina cruda del material proteico (desecho sólido/líquido del proceso), para continuar con el proceso de purificación por la vía química.

#### **4.4.4 Proceso Químico para purificar la quitina**

- a. La quitina cruda se introdujo en un beaker de 2 L y se le agregó NaOH al 5%, en una relación de 200 L/50 kg de material, para asegurar la separación de toda la proteína residual. La mezcla se agitó por 1 hora con un agitador magnético para favorecer la correcta agitación y posteriormente, el líquido fue

separado con ayuda de un colador y el sólido fue lavado con agua destilada para eliminar todo el NaOH residual.

- b. El producto se trató con una solución de hipoclorito de sodio al 0.38% para asegurar el blanqueado total de la quitina, en una relación de 8 L/kg de material. La mezcla se agitó por  $\frac{1}{2}$  hora con un agitador magnético y posteriormente, el líquido fue separado con ayuda de un colador y el sólido fue lavado con agua destilada para eliminar todo el NaClO residual.
- c. Finalmente, para eliminar toda la humedad de la quitina producida, el material se introdujo en un horno a una temperatura entre 45–50°C, durante 24 horas.
- d. Al producto final se le realizó el análisis espectral para determinar el grado de correlación (Gr) y también se determinó, el porcentaje de rendimiento (Pr)

En la Figura A.1 del Anexo A.I se muestra el Diagrama de flujos del proceso de obtención de quitina y proteína residual.

#### **4.4.5 Análisis espectral de la quitina**

En esta etapa se procedió a evaluar la pureza de la quitina producida. Para ello, se obtuvieron los espectros IR de la quitina producida utilizando el Equipo FT-IR con accesorio ALPHA T. Estos espectros fueron comparados con una muestra patrón de Quitina proporcionada por Jining Green Group Co. Ltd, Shandong, China.

La muestra seca de quitina se trituró en un mortero de porcelana hasta lograr una consistencia de polvillo y se mezcló con bromuro de potasio (KBr) puro y seco, en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino.

Una pequeña porción del polvo obtenido, se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas empleando para ello una prensa. Es importante evitar la contaminación de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla.

La pastilla, que debe ser homogénea y finísima, se colocó en una placa para muestras y se inserta en el Espectrofotómetro Alpha FTIR – Bruker. Posteriormente, se obtuvieron los espectros de la quitina obtenida y se realizaron los grados de correlación (Gr) de espectros IR con la quitina comercial. Los gráficos de los Espectros IR se encuentran en el Anexo XI (CD)

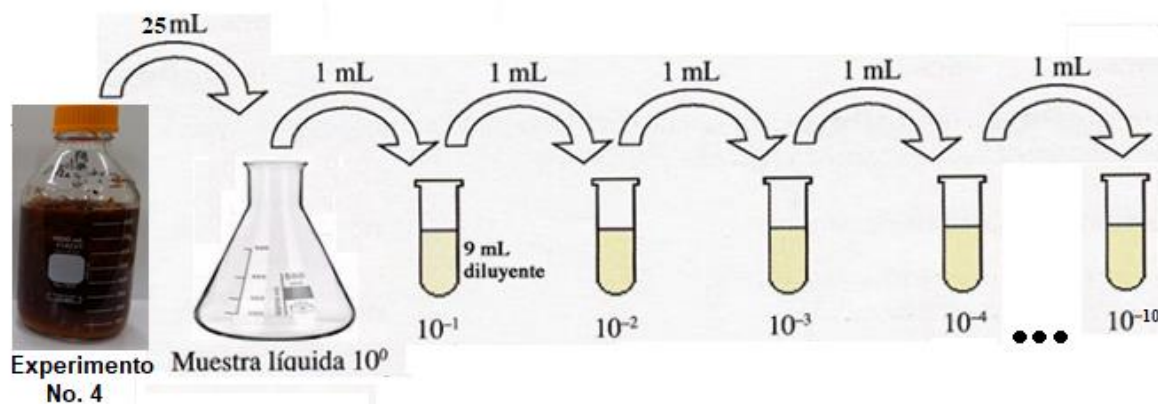
#### 4.4.6 Aislamiento e Identificación de las bacterias

El siguiente procedimiento permitió determinar la concentración, aislamiento, identificación y caracterización de las bacterias en estudio. Para ello, se utilizó una muestra líquida del Experimento No. 4 con sustrato azúcar, fermentación de 14 días y pH de 3.59. Este reactor fue seleccionado por tener el mayor nivel de inóculo y mayor pH respecto a los otros experimentos el día de la prueba.

##### 4.4.6.1 Determinación de la concentración de bacterias

Para determinar la concentración de bacterias se realizó la primera dilución en un matraz Erlenmeyer de 1 litro, adicionando 25 ml de muestra del reactor de fermentación láctica del Experimento No. 4, en 225 ml de agua peptonada al 0.1%, como diluyente.

A continuación, se tomó 1 ml de la primera dilución y se inyectó en el tubo de la dilución 2, el cual contenía 9 ml de agua peptonada. Este procedimiento de dilución se repitió hasta tener la dilución número 10, según el esquema que se muestra en la Figura 4.2. Con esto, se obtuvieron diluciones de  $1/10^1$ ,  $1/10^2$ ,  $1/10^3$ ,  $1/10^4$  ...  $1/10^{10}$ , el denominador de estas fracciones se le llama factor de dilución.



**Figura 4.2** Esquema de dilución para la determinación de la concentración de bacterias.

Posteriormente, se tomó 1 ml de cada dilución y se agregó en placas de Petri por duplicado, las cuales contenían agar MRS. La placa se agitó para garantizar una distribución uniforme de la muestra, luego estas se rotularon e incubaron a 30°C por 72 horas.

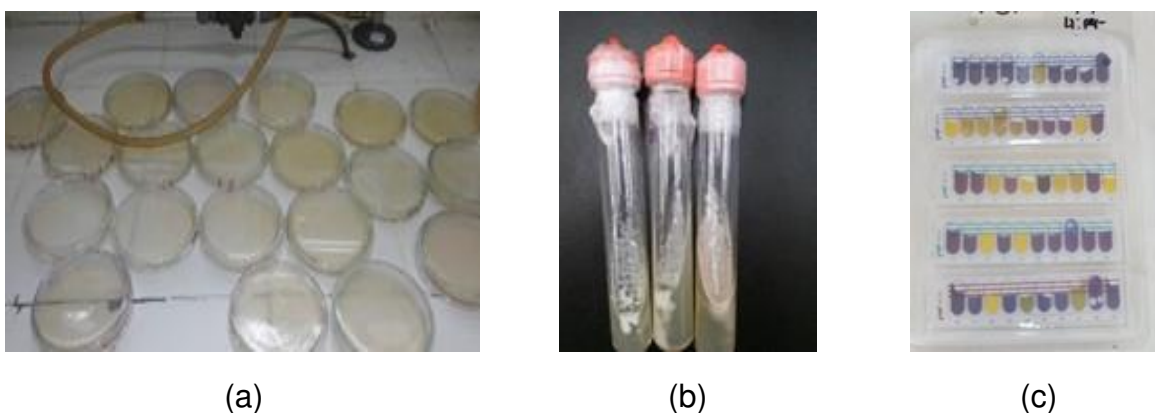
Al término de las 72 h, se tomaron aquellas placas que presentaban un conteo de Unidad Formadora de Colonias (UFC) mayor de 30 y menor a 300.



Subsiguientemente, se contaron las colonias presentes en las placas que se seleccionaron, se promedió y se multiplico por el factor de dilución.

#### 4.4.6.2 Aislamiento de bacterias

Las placas que presentaban un conteo de UFC mayor de 30 y menor a 300 y su duplicado fueron utilizadas para el aislamiento de las cepas (Figura 4.3.a). Posteriormente, se tomó una muestra de cada colonia con el asa de cultivo estéril y se diseminaron en la superficie inclinada del medio de cultivo agar MRS, contenidas en viales (Figura 4.3.b). Estos viales con cultivo axénico se incubaron a 30 C por 72 horas, para preservar las cepas se resembraron periódicamente en agar fresco. A cada una de las cepas (colonias) se le realizaron pruebas de identificación mediante morfología microscópica y macroscópica, pruebas bioquímicas presuntivas y por micro métodos utilizando el sistema miniaturizado Api.



**Figura 4.3** (a) Aislamiento y seriado de dilución, (b) viales con cepas y (c) plantilla plástica del sistema miniaturizado API 50 CH.

#### 4.4.6.3 Caracterización e Identificación de las bacterias ácido lácticas

Para examinar las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias presentes en la colonia, se realizaron los siguientes procedimientos:

- La tinción de Gram (ítem A.2.2 del Anexo II),
- Se caracterizó la catalasa usando peróxido de hidrogeno (ítem A.2.3 del Anexo II),
- La prueba de oxidasa con reactivo de korvac (ítem A.2.4 del Anexo II), y
- La prueba de gota colgante para determinar motilidad (ítem A.2.5 del Anexo II).

Para identificar la bacteria de la colonia o cultivo puro se utilizó el sistema miniaturizado API 50 CH, en conjunto con el médium API 50 CHL empleado para identificar lactobacillus y microorganismos próximos.

El sistema consta de una plantilla plástica con una serie de galerías de 50 microtubos con 49 sustratos fermentables (carbohidratos) y un testigo. Los resultados establecieron los perfiles de fermentación de carbohidratos de los microorganismos muestra. El sistema se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante, proporcionadas en la ficha técnica del producto (procedimiento en el ítem A.2.6 del Anexo II)

#### **4.4.7 Análisis del material proteico**

Al material proteico (desecho sólido/líquido del proceso de fermentación láctica) obtenido en el inciso f del ítem 4.4.3, se le realizaron las siguientes pruebas:

- Determinación de la presencia de aminoácidos en el material (Reacción Xantoproteica), Ítem A.3.1 del Anexo II.
- Cuantificación del contenido de proteína total mediante la determinación de nitrógeno por el Método Kjeldahl., Ítem A.3.2 del Anexo II

Para llevar a cabo estas determinaciones se seleccionaron ocho muestras considerando el diseño experimental, el cual consta de dos replicas (Tabla A.10 del Anexo IV).

El material proteico, una muestra de desecho de camarón y una muestra de suero láctico fueron preservadas en refrigeración para el posterior análisis de proteínas, las cuales fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos LABAL.

#### **4.4.8 Diseño Experimental**

##### **4.4.8.1 Tratamiento**

Para determinar el número de tratamiento se utilizó el software STATGRAPHICS PLUS, utilizando el método multifactorial donde se usó una fase explorativa y posteriormente una fase de verificación.

- Número de Factores Experimentales: 3
- Niveles: 2
- Número de Respuestas: 2
- Número de Réplicas: 2
- Número de Corridas: 24

#### 4.4.8.2 Factores

Los factores o variables experimentales seleccionados fueron concentración de inóculo, tipo de sustrato y tamaño de partícula, los cuales se fundamentan en investigaciones previas (Cira et al., 2002; Marcia et al., 2013 y Pacheco-López, 2010) y fase explorativa.

Lo que respecta a la temperatura no se toma como factor ya que, según la literatura, las bacterias presentes en el proceso de fermentación láctica se clasifican como mesófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 15 y 35°C (Pascual Anderson y Calderón de Pascual, 2000).

Con los factores independientes seleccionados (Tabla 4.1) se pretende garantizar una óptima acidez inicial (pH entre 3 y 3.5), lo cual evita la putrefacción y mejora la desmineralización del material.

#### 4.4.8.3 Niveles

En los factores seleccionado se tomaron dos niveles, los cuales se reflejan en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2** Factores y niveles del diseño experimental.

Factores	Niveles	Observación
Tamaño de partícula	2	<b>Tp1: Menor (menor a 3.35 mm)</b> <b>Tp2: Mayor (mayor a 3.35 mm)</b>
Concentración de inóculo (v/v)	2	<b>5%</b> <b>10%</b>
Sustrato	<b>2</b>	<b>Azúcar</b> <b>Melaza</b>

#### 4.4.8.4 Variables de repuesta

Las variables repuestas para los factores o variables controladas se reflejan en la siguiente tabla.

**Tabla 4.3** *Tabla de las variables de repuesta.*

<b>Respuestas</b>	<b>Unidades</b>
Porcentaje de rendimiento (Pr)	%
Grado de correlación (Gr)	%

La Tabla de número de experimento y cruce de variables puede observarse en la Tabla A.5 del Anexo IV.

#### 4.4.8.5 Análisis Estadístico de los datos

Para el análisis de los datos, se utilizó el análisis de varianza ANOVA con el software estadístico Statgraphics Centurión XVIII. Este ejecuta un análisis de varianza de varios factores para el Grado de correlación (Gr) y Porcentaje de recuperación (Pr).

El software realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Gr y Pr. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos.

Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirá identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuales medias son significativamente diferentes de otras. La Gráfica de Medias y la Gráfica de Interacciones le ayudarán a interpretar los efectos significativos. Las Gráficas de Residuos ayudan a juzgar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los principales resultados y su discusión del trabajo experimental realizado. Se establecen las condiciones de operación (Tamaño de partícula, concentración de inóculo (v/v) y tipo de sustrato) en el proceso de fermentación láctica para la recuperación de quitina y material proteico, en función del grado de correlación del espectro IR la quitina producida con respecto al de una quitina comercial, y el porcentaje de rendimiento.

Así también, se evalúa el comportamiento del proceso de fermentación ácido láctica a través del monitoreo del pH y el porcentaje de Acidez Total Titulable (ATT); y se presentan los resultados de la identificación de las bacterias presentes en la fermentación, empleando el sistema API 50CHL en conjunto con el medium API 50 CHL, y su caracterización por medio de la tinción de Gram y las pruebas de catalasa, oxidasa y de motilidad; así como, la caracterización de las proteínas usando la prueba xantoproteica.

### 5.1 Condiciones de operación en el proceso de fermentación láctica

Para la recuperación de quitina por fermentación láctica de desechos de camarón rojo de mar, *Farfantepenaeus brevisrostris* (Rivera, 2008), se evaluaron las condiciones de operación (factores independientes): Tamaño de partícula (menor a 3.35 mm y mayor a 3.35 mm), concentración de inóculo (5 y 10% v/v) y tipo de sustrato (azúcar sulfitada comercial y melaza con un contenido de sólidos de 78°Brix), los cuales se fundamentan en investigaciones previas (Cira et al. (2002); Marcia y Malespin. (2013); Pacheco-López (2010)).

El producto de la fermentación se encuentra constituido por una parte sólida rica en quitina y una fracción rica en subproductos tales como material proteico, lípidos, lactato de calcio, ácido láctico, minerales y pigmentos, todos con un alto valor comercial.

Posterior a la purificación química de la quitina, con hidróxido de sodio al 5.0 % e hipoclorito de sodio al 0.38% para eliminar las trazas de proteína y pigmentos, se observó que todavía predominaba un color rojizo tenue en las muestras fermentadas con melaza contrario a la quitina fermentada con azúcar. Además, se observó que en aquellos trozos que eran parte de la cola del camarón, aún persistía el color rojizo, muy difíciles de eliminar por su forma de escobilla. Al final, las muestras se trituraron y se prepararon para el análisis espectral IR y el pesaje.

Los resultados del Grado de Correlación (Gr) y Porcentaje de Recuperación (Pr) de la quitina producida en función de los factores independientes se presentan en la Tabla A.5 del Anexo IV.

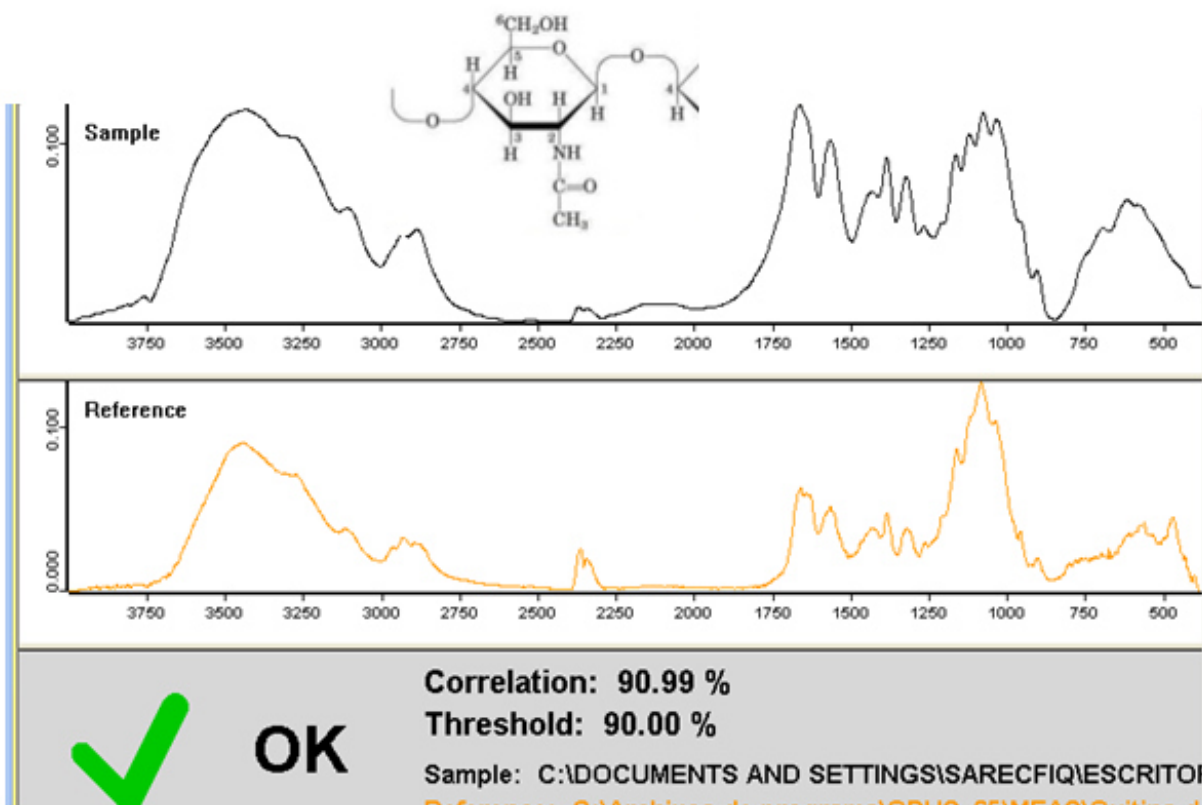
Para el análisis de los datos, se utilizó el análisis de varianza ANOVA con el software estadístico Statgraphics Centurión XVIII, el cual ejecutó un análisis de la varianza de los factores para Gr y Pr, para determinar cuáles de estos tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Gr y Pr.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos y su discusión.

### **5.1.1 Análisis de Espectros IR y grados de correlación**

El análisis de espectroscopia infrarroja permitió obtener los espectros IR de Absorbancia en función del número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de las diferentes muestras de quitina, siendo la principal utilidad de este tipo de gráficos la determinación de las estructuras de especies orgánicas.

Así también, el grado de correlación, en porcentaje, fue determinado por la comparación del espectro IR de la quitina comercial con los espectros de la quitina obtenida en cada experimento. En la Figura 5.1 se puede observar el espectro IR de la quitina producida por las condiciones de trabajo del Experimento 11 (**Sample**) y de la quitina comercial (**Reference**); así como también, el grado de correlación entre ambos espectros, el cual fue del 90.99%. Las gráficas de los veinticuatro experimentos se pueden observar en la carpeta (5.1.1) “Espectros IR y correlación” del material digital complementario.



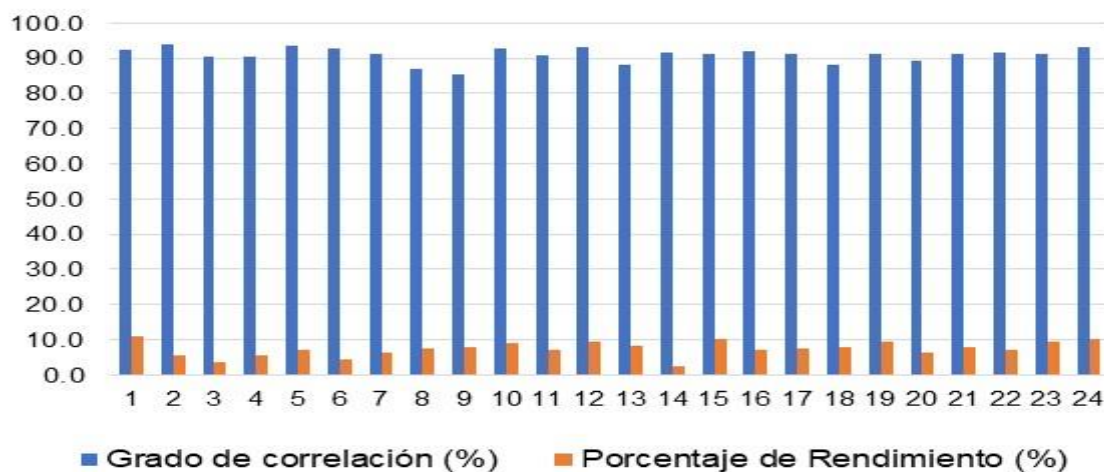
**Figura 5.1** Espectros Ir de la quitina obtenida del Experimento 11 (Sample) y de la quitina comercial (Reference).

El análisis cualitativo del espectro IR implica dos etapas. La primera se refiere a la determinación de los grupos funcionales que estén presentes analizando las frecuencias respecto al número de onda. La segunda etapa consiste en comparar detalladamente el espectro IR del compuesto desconocido con los espectros de compuestos puros. Esta etapa es la que se usó para comparar la quitina obtenida de los 24 experimentos.

Para comparar los espectros de dos compuestos se usa generalmente la región conocida como huella dactilar que comprende números de onda entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ , debido a que pequeñas diferencias en estructuras y la constitución de una molécula provocan cambios significativos en esta región. Así también, el equipo realiza comparaciones matemáticas de una región mayor a la de huella dactilar, la cual comprende un intervalo de número de onda desde  $500\text{ cm}^{-1}$  hasta  $3750\text{ cm}^{-1}$ .

Para este caso, el espectro IR de la Figura 5.1 muestra una banda ancha de  $3400$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo O–H, una banda de intensidad media alrededor de  $3250\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo N–H de la amida, una banda de intensidad fuerte entre  $2850 - 2970\text{ cm}^{-1}$  del grupo C–H, banda de la amida I a  $1657$  y  $1627\text{ cm}^{-1}$ , banda N–H a  $1434\text{ cm}^{-1}$ , banda del enlace glucosídico C–O–C a  $1072\text{ cm}^{-1}$  y a  $848$

cm<sup>-1</sup> bandas de la tensión de los grupos anoméricos. El gran parecido de los espectros IR de ambos polímeros en estas regiones, constituye una evidencia de su identidad. En la Figura 5.2 se presenta, de manera gráfica, el grado de correlación (%) de los 24 experimentos. En la tabla 5.1 se presenta los datos tabulados.



**Figura 5.2** Resultados del grado de correlación y porcentaje de rendimiento de la quitina obtenida de los 24 experimentos.



**Tabla 5.1** Medias de los resultados de gr y pr. 1 en base seca

No.	Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	Media del Grado de Correlación (Calidad de la quitina)	Media del Porcentaje de Rendimiento de quitina <sup>1</sup>
1	Menor a 3.35 mm	Melaza	10%	91.51±0.74	9.73±1.81
2	Menor a 3.35 mm	Azúcar	5%	92.36±2.00	4.59±0.86
3	Menor a 3.35 mm	Azúcar	10%	91.27±0.69	6.35±1.22
4	Menor a 3.35 mm	Melaza	5%	91.78±1.14	9.28±0.27
5	Mayor a 3.35 mm	Azúcar	10%	91.98±1.69	7.29±0.37
6	Mayor a 3.35 mm	Melaza	10%	90.66±3.79	8.21±1.86
7	Mayor a 3.35 mm	Azúcar	5%	87.22±1.67	7.99±0.18
8	Mayor a 3.35mm	Melaza	5%	89.93±1.11	6.41±0.02
Media de Resultados				90.84±1.87	7.48±1.91

### 5.1.2 Análisis de ANOVA. Interacción de variables

La Tabla ANOVA descompone la variabilidad del Grado de correlación (Gr) y el Porcentaje de Rendimiento (Pr) en contribuciones debidas a los factores:

- Rango de tamaño de partícula [1] < 0.45 a 3.5 mm y [2] 3.35 a mm a > 6.3 mm,
- Concentración de inóculo [1] 5% y [2] 10% y,
- Tipo de sustrato [1] azúcar y [2] melaza.

El análisis de estos factores, usando el método ANOVA, permiten visualizar su interacción con Gr y Pr. Por su parte, los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

### **5.1.2.1 Grado de Correlación (Gr) e interacción de variables**

La Tabla A.20 del Anexo A.10.1 muestra el análisis de varianza para Gr. Esta indica que dos valores-P son menores que 0.05: tamaño de partícula (A: Tp) y la interacción AC (tamaño de partícula – concentración de inóculo), los cuales tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Gr con un 95.0% de nivel de confianza.

La media global, presentada en la Tabla A.21 (Anexo A.10.1) muestra un valor de Gr de 90.83% como valor de correlación, para todos los factores y sus interacciones con un intervalo de confianza del 95%. Esto quiere decir que la quitina obtenida se parece un 90.83 % en promedio a la quitina comercial (Figura 5.2).

La Tabla A.15 también indica que la variable independiente que presentó el mayor valor de media fue el menor rango de tamaño de partícula con un 91.73% y la interacción que generó la media más alta fue la de menor Tamaño de partícula – concentración de inóculo de 5 %, con un 92.07%, con un intervalo de confianza del 95

### **5.1.2.2 Porcentaje de Rendimiento (Pr) e interacción de variables**

Para la determinación de los porcentajes de rendimiento de quitina se tomó como base los siguientes datos:

- Peso en base húmeda: 125.00 g caparazón de camarón
- Porcentaje promedio de Humedad: 41.5% (lo cual corresponde a 51.87 g)
- Peso en base seca: 73.13 g

De acuerdo a los datos experimentales (Tabla A.18 del Anexo VIII), los porcentajes de rendimientos de quitina están entre un máximo de 10.92% y un mínimo de 2.32%. Los bajos rendimientos pueden deberse a pérdidas en el filtrado de muestras lavadas por el tamaño grande del tamiz. Sin embargo, estos rendimientos son mayores que aquellos reportados por Martínez (2009, pág. 55) de 2.38% para desecho de camarón fermentado, fresco y molido; y por Rao (2010 citado en Martínez 2009 pág. 55) de 4.5 %. Estos reportan las pérdidas como resultado de desplazamiento de quitina como agregado de pequeñas partículas arrastradas en el filtrado y lavado durante el proceso de obtención.

De acuerdo al análisis estadístico, los valores-P menores a 0.05 tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Pr con un 95.0% de nivel de confianza. De acuerdo a la Tabla A.22 del Anexo A.10.2, dos valores son menores a 0.05 y corresponden a la variable de tipo de sustrato (B: sust) y la interacción AB (tamaño de partícula – sustrato). Esto indica, que el sustrato y el tamaño de partícula repercuten directamente en los Porcentajes de rendimientos de la quitina obtenida.

Por otro lado, el análisis de media para Pr, con un intervalo de confianza del 95%, muestra una media global de 7.44 % (Tabla A.23 del Anexo A.10.2). La variable independiente que presentó mayor valor de media de Pr fue el sustrato melaza con un 9.53% y la interacción que generó la media más alta de Pr fue sustrato melaza – menor tamaño de partícula con un 10.72%.

## **5.2 Condiciones de operación en el proceso de fermentación láctica**

El comportamiento del proceso de fermentación ácido láctica, a diferentes condiciones de operación, se evaluó a través del monitoreo del pH y el porcentaje de acidez total titulable (ATT) en cada uno de los experimentos y del Reactor Madre. Para ello, se tomaron muestras de 20 ml del líquido de fermentación producido cada cierto tiempo, hasta completar las dos semanas de fermentación. Los resultados se detallan en las Tablas de la A.6 a la A.14 del Anexo V.

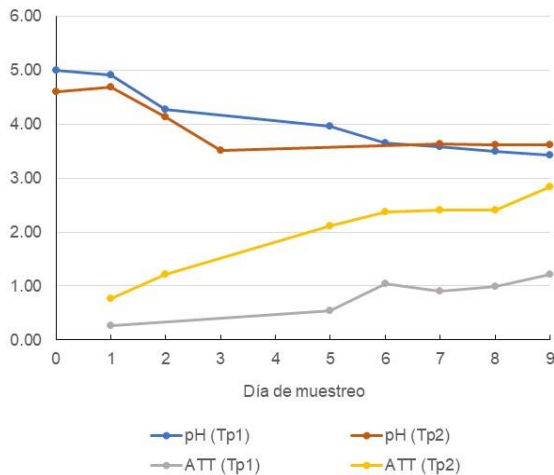
La fermentación ocurre en tres etapas Fermentación Primaria, Fermentación Secundaria y post-fermentación (Procesoliva, 2011). Por el tiempo de fermentación y las características de pH y el ATT se asume que los experimentos alcanzaron la fermentación secundaria caracterizada por la alta acidez y la consecuente inhibición de la mayoría de bacterias y levaduras además la presencia suficiente de carbohidratos, si se hubiera alcanzado la post-fermentación se observaría el deterioro de la quitina (putrefacción) y el agotamiento de los carbohidratos.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos y su discusión.

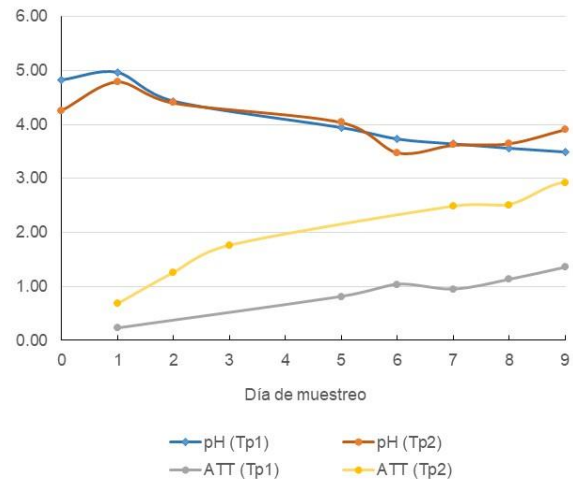
### **5.2.1 Tamaño de partícula**

Los gráficos de la Figura 5.3 muestra los resultados del seguimiento del pH y la ATT a diferentes rangos de tamaños de partícula: Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y Tp2 (3.35 a mm a >6.3 mm), manteniendo constantes las variables sustrato y concentración de inóculo.

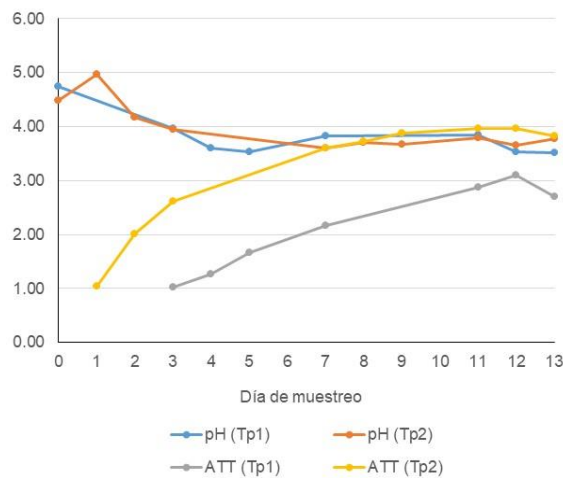
De acuerdo a los resultados gráficamente mostrados, en todos los casos se observa una disminución del pH y un aumento de la ATT (o porcentaje de ácido láctico) producto de la acción microbiana. Así también, los resultados indican que independientemente del tipo de sustrato y el porcentaje de inóculo, a mayor tamaño de partícula (Tp2) la producción de ácido láctico es mayor, lo cual se ve reflejado en el aumento de ATT; y a menor tamaño de partícula (Tp1) la acidificación se realiza en menor tiempo de fermentación. Esto se debe a que a menor tamaño de partícula se mejora la superficie de contacto lo cual facilita la solubilización de los minerales y la disponibilidad del sustrato a las bacterias (Pacheco-López, 2010, pág. 88).



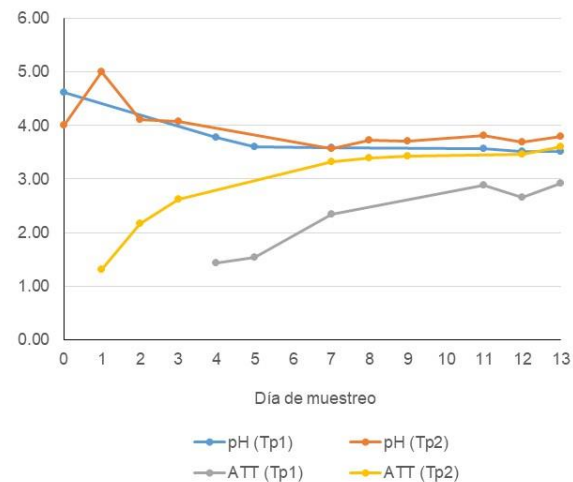
(a) Con azúcar y 5% de inóculo



(b) Con azúcar y 10% de inóculo



(c) Con melaza y 5% de inóculo



(d) Con melaza y 10% de inóculo

**Figura 5.3** Comportamiento de pH y ATT a diferentes tamaños de partículas (Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm)).

Pacheco-López (2010, pág. 88) documenta que la fase estacionaria de las bacterias se logra en menor tiempo con un tamaño de partícula promedio de 1 mm; esto podría explicar la menor producción de ácido láctico al ser la fase de crecimiento exponencial bacteriana corta.

Los datos experimentales mostrados en las Tablas del A.7 al A.14 del Anexo V, muestran que aproximadamente en el octavo día de fermentación, la reducción de pH y ATT varían poco, lo cual coincide con lo observado por Marcia y Malespín (2013, pág. 42); indicando que dos semanas de fermentación es suficiente para garantizar una buena desproteinización y desmineralización del material.

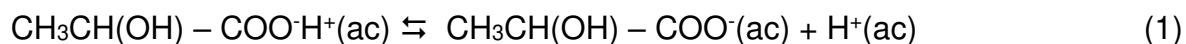
Así también, las gráficas de las variables de control (pH y ATT) permiten confirmar la presencia de bacterias microaerófilos y la producción de ácidos orgánicos que facilitan la desmineralización del biomaterial y favorecen la hidrólisis de las proteínas a aminoácidos mediante la producción de enzimas (Benítez, Ibarz y Pagan, 2008, Resumen).

### 5.2.2 Tipo de Sustrato

En los gráficos de la Figura 5.4 se presenta el comportamiento del pH y la ATT usando diferentes sustratos: Azúcar y Melaza, manteniendo constantes las otras variables (Tamaño de partícula y concentración de inóculo).

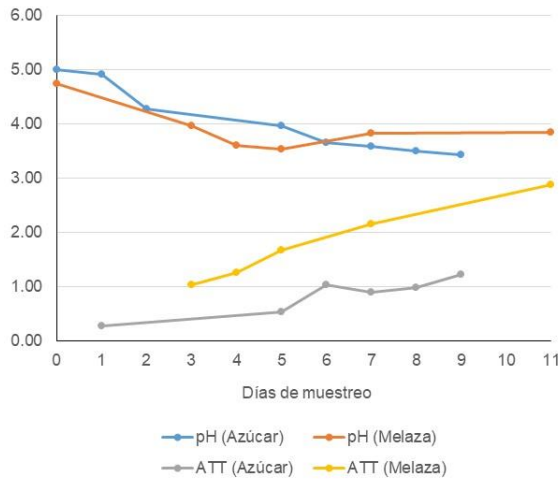
Los resultados también muestran que en todos los casos hay una disminución del pH y un aumento de la ATT (o porcentaje de ácido láctico) durante el período de fermentación.

Así también, se puede observar que en el caso del pH hay poca diferencia entre los resultados obtenidos independientemente del tipo de sustrato utilizado. Esto se debe a que el ácido láctico producido durante la fermentación ácido láctica es un ácido débil con un pKa de 3.86 y el pH, por lo tanto, dependerá grandemente de la disociación del ácido láctico a lactato:

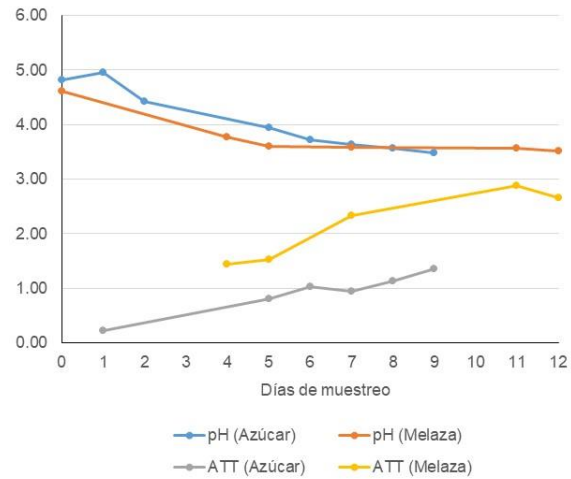


$$pH = pKa + \log \frac{[\text{R-COO}^-]}{[\text{R-COOH}]} = 3.86 + \log \frac{[\text{R-COO}^-]}{[\text{R-COOH}]} \quad (2)$$

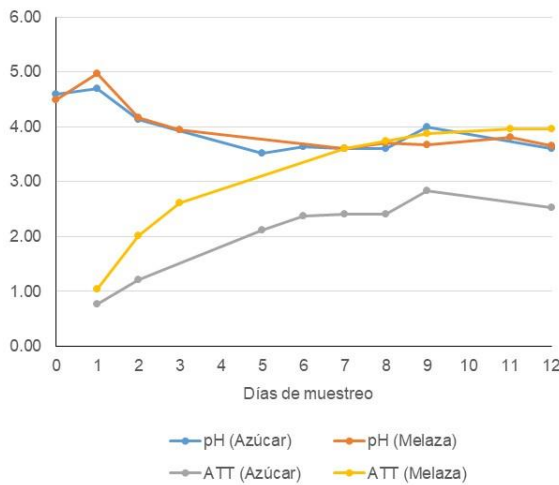
Mientras, en el caso del ATT, se observa que este es mayor en los reactores alimentados con melaza; lo cual indica que hay una mayor producción de ácido láctico. Esto puede deberse a que en la melaza hay una concentración elevada de carbohidratos totales solubles (aproximadamente del 46%) y de carbohidratos reductores (aproximadamente 33.8%); así como la presencia de minerales tales como sodio, potasio, calcio y magnesio (Gómez, Nápoles, Núñez y Martínez, 2008) y de otros nutrientes en cantidades significativas como vitaminas, importantes para el crecimiento microbiano (Castro, 1993 citado en Fajardo y Sarmiento, 2007, pág. 31).



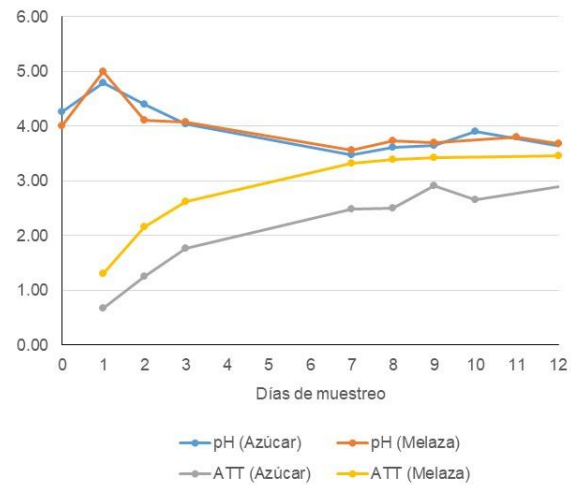
(a) Con Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y 5% de inóculo



(b) Con Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y 10% de inóculo



(c) Con Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm) y 5% de inóculo

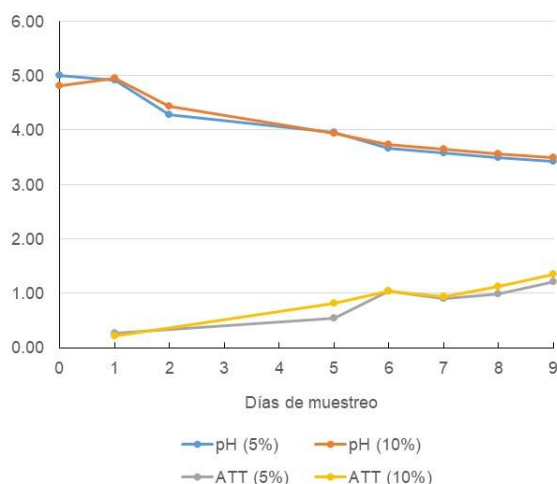


(d) Con Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm) y 10% de inóculo

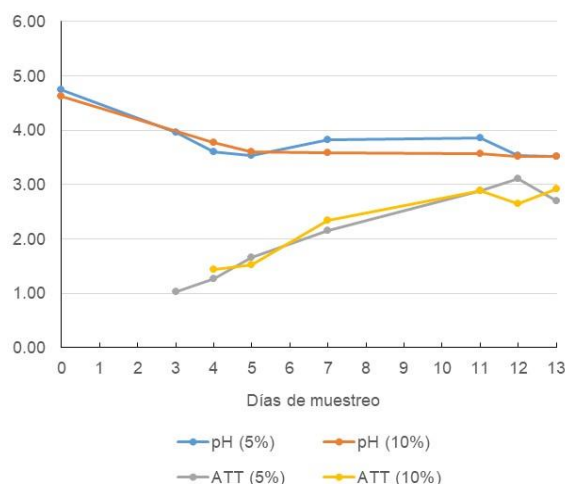
**Figura 5.4** Comportamiento de pH y ATT usando diferentes sustratos (Azúcar y Melaza).

### 5.2.3 Nivel de inóculo

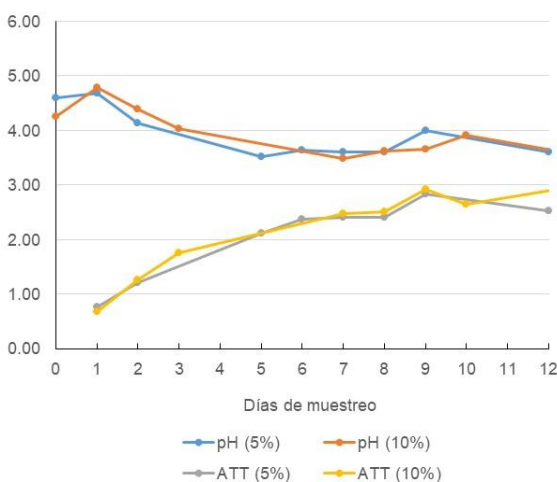
En los gráficos de la Figura 5.5 se presenta el comportamiento del pH y la ATT usando diferentes concentraciones de inóculo (5 y 10%), manteniendo constantes las otras variables (rango de tamaño de partícula y tipo de sustratos). Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los datos de pH y ATT, independiente del tipo de sustrato utilizado y el tamaño de partícula.



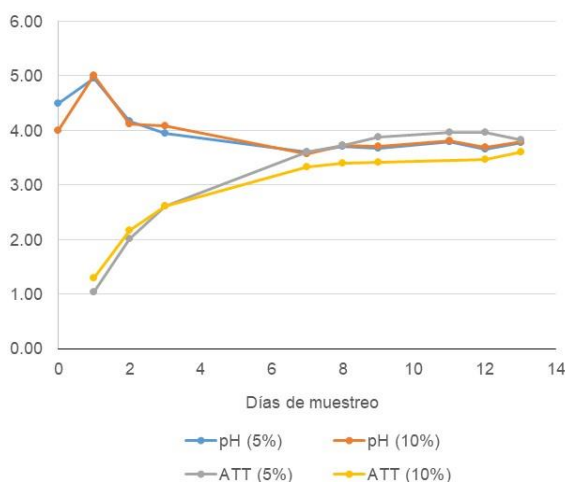
(a) Con Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y Azúcar



(b) Con Tp1 (< 0.45 a 3.5 mm) y Melaza



(a) Con Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm) y Azúcar



(b) Con Tp2 (3.35 a mm a > 6.3 mm) y Melaza

**Figura 5.5** Comportamiento de pH y ATT usando diferentes concentraciones de inóculo (5 y 10%).

### 5.3 Aislamiento e Identificación de bacterias ácido láctica

En este ítem se presentarán los resultados de la determinación de la concentración, aislamiento, identificación y caracterización de las bacterias presentes en el proceso de fermentación ácido láctica del Experimento No. 4, en el cual se usó caparazón de camarón, suero lácteo, azúcar como sustrato y una concentración inicial de inóculo del 10%.

### 5.3.1 Determinación de la Concentración y aislamiento de las bacterias

Para determinar la concentración de bacterias, se tomaron las placas de la dilución 6 por tener un conteo de UFC mayor de 30 y menor a 300, indicando un resultado de  $7.95 \times 10^7$  UFC/ml. De estas mismas placas se aislaron tres colonias identificadas como colonia 1, 2 y 3 (Figura 5.6).



**Figura 5.6** Colonias aisladas en agar MRS de la placa de dilución 6 del Experimento No. 4 de la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón, especie *Farfantepenaeus brevisrostris*, utilizando suero lácteo y azúcar sulfitada como sustrato.

A cada una de las tres cepas (colonias) se le realizaron pruebas de identificación mediante morfología microscópica y macroscópica, pruebas bioquímicas presuntivas y por micro métodos utilizando el sistema miniaturizado Api. A continuación, se describe los resultados obtenidos.

#### 5.3.1.1 Morfología macroscópica

Las características morfológicas de las colonias aisladas son las siguientes:

- Colonia 1, se observó que presentaban un aspecto blanco convexos, redonda con bordes regulares, aerobia y pequeña (Figura 5.6.a).
- Colonia 2, se observó una grande plana con bordes regulares y microaerófilo por su crecimiento debajo del medio de cultivo (Figura 5.6.b).
- Colonia 3, se observó que esta era microaerófilo, pequeña, alargada y puntiforme (Figura 5.6.c).

Estas características corresponden a aquellas observadas en colonias aisladas de bacterias ácido lácticas por Balderas (2006).



### 5.3.1.2 Morfología microscópica, tinción de gran y motilidad

Para la morfología microscópica se utilizó microscopia de campo luminoso. Para ello, se tomó una muestra de cada colonia con un asa estéril se diseminó sobre la lámina porta espécimen usando una gota de agua estéril y desionizada, y se fijó por calor indirecto (frotis de secado) (Figura 5.7.a). Se fueron probando los objetivos del microscopio hasta lograr enfocar las bacterias:

- Los frotis de la colonia 1 presentan una forma bacilar alargada,
- Los frotis de la colonia 2 se observan como cocobacilos,
- Los frotis de la colonia 3 son como bacilo corto.

Estas formas coinciden con lo reportado por Páramo (2013) para grupos de microorganismos ácido lácticos. La limitada presencia de bacterias con forma de cocos podría estar restringida por uso del medio de cultivo agar MRS específico para bacilos, el uso del medio agar M17 específico para estreptococos confirmarían o negarían la presencia de más especies con forma de coco (LabM, 2018).



(a)



(b)

**Figura 5.7** (a) Frotis en portaobjeto y (b) Tinción de gram.

Posteriormente, se realizó una coloración de gram donde el frotis bacteriano se somete a soluciones de cristal violeta, solución de yodo, alcohol y safranina (Figura 5.7.b). Las bacterias sometidas al método de gram pertenecen a dos grupos, bacterias gram positivas, que retienen el cristal violeta y aparecen con color violeta profundo; las bacterias gram negativas que pierden el cristal violeta y por el contraste de la safranina aparecen rojas o rosadas al espectador.

Los frotis de las colonias identificadas presentaron un color violeta profundo y por lo tanto, se identifican como gram positivas, esto coincide por lo afirmado por Páramo (2013) como característica representativa de las bacterias ácido lácticas.

Subsiguientemente, se preparó la determinación de la motilidad de las bacterias por medio de la Técnica de gota pendiente. Para ello, se prepararon diluciones de agua estéril y desionizada a las cuales se inoculó una pequeña muestra de cada colonia;

luego, se colocó una gota de cada dilución en el centro de un portaobjeto colocado invertido encima del área cóncava de un portaobjetos excavado.

Para disminuir el ritmo de la evaporación y evitar las corrientes de aire, la preparación debe bordearse con parafina o una sustancia similar y sellar así el espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Las tres colonias presentaron motilidad negativa, lo cual coincide con Páramo (2013) el cual describe a las bacterias ácido lácticas como microorganismos no móviles.

#### **5.1.3.3 Pruebas bioquímicas presuntivas**

Las pruebas de catalasa indicaron que las colonias son catalasas negativas puesto que no reaccionaron con el peróxido de hidrógeno; las bacterias del género ácido lácticas son catalasas negativas (Paramo, 2013).

Por otro lado, las pruebas de oxidasa indicaron que todas las colonias se identificaron como oxidasa negativa puesto que no hubo viraje de color al agregar el reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs).

#### **5.1.3.4 Pruebas bioquímicas Api**

Para la identificación bioquímica de las bacterias se utilizó el kit API 50 CH, API 50 CHL y el software API web. Los resultados obtenidos representan el perfil bioquímico de las cepas aisladas. El porcentaje de identificación y las pruebas en contra se pueden observar en la carpeta (5.1.3.4) “Resultados sistema API” del material digital complementario.

Mediante el kit API se identificaron y caracterizaron dos bacterias *Lactobacillus paracasei* 1 y *Leuconostoc mesenteroides cremoris* las cuales resistieron las condiciones ambientales de los reactores. Según Baskhar (2007, citado en Arévalo Illescas, 2016, pág. 19), los conglomerados de bacterias lácticas presentan buenos resultados de desproteinización, aproximadamente del 97%, y desmineralización, aproximadamente del 72,5 %.

Aunque las colonias 1 y 3 presentan apariencias diferentes, a pesar de ser la misma especie; esto depende del estado de la célula al momento de inocular, de la incubación y la preparación del medio (Pelczar, Reid y Chan, 1977)

Los lactobacillus son bacilos generalmente en cadenas, son anaerobios facultativos o microaerófilos y presentan dos tipos de fermentación: homofermentativa y heterofermentativa. En cambio, los Leuconostoc son cocos en forma reticular o esférica y poseen un metabolismo heterofermentativo, es decir, forma ácido D-láctico, CO<sub>2</sub> y etanol cuando fermentan las hexosas. Esto explica la producción de gas (CO<sub>2</sub>) y la mayor producción de ácido láctico por las bacterias presentes en el

proceso de fermentación ácido láctica (García Ruíz, 1998; citado en Hernández, Pantoja y Turriago (2002) pág. 16).

En la Tabla 5.2 se resumen los resultados obtenidos de la identificación y caracterización de las colonias aisladas.

**Tabla 5.2** Características de bacterias identificadas en el Experimento de fermentación ácido láctica No. 4.

Colonia No.	1	2	3
Descripción de la colonia	Blanca, redonda de bordes regulares, pequeña y convexa, aerobia.	Blanca, redonda de bordes regulares, grande y plana, micro aerófila.	Blanca, alargada y puntiforme, pequeña e interna, micro aerófila.
Morfología celular	Bacilar alargada	Cocobacilo	Bacilo corto
Catalasa	negativa	negativa	negativa
Oxidasa	negativa	negativa	negativa
Gram	positiva	positiva	positiva
Motilidad	negativa	negativa	negativa
Cepa identificada	<i>Lactobacillus paracasei</i> 1	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> 1

Las características determinadas de las bacterias aisladas e identificadas (Tabla 5.1) coinciden con las características de las bacterias ácido lácticas como ser gram positivas, microaerófilas, cocoides y bacilares, heterofermentativas y homofermentativas.

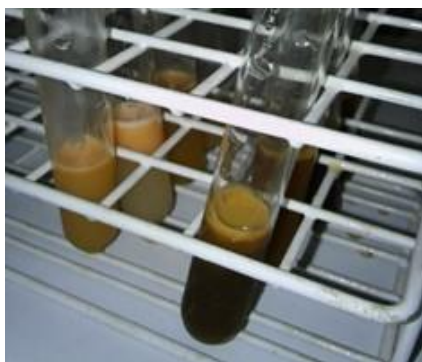
## 5.4 Análisis de proteínas

El análisis de las proteínas en el residuo líquido/sólido (material proteico), producto de la fermentación ácido-láctica, se basó en la reacción xantoproteica y la determinación de nitrógeno total usando el método Kjeldahl. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente 8 muestras tomando en cuenta que el diseño experimental consta de dos replicas (Tabla A.17 del Anexo VII).

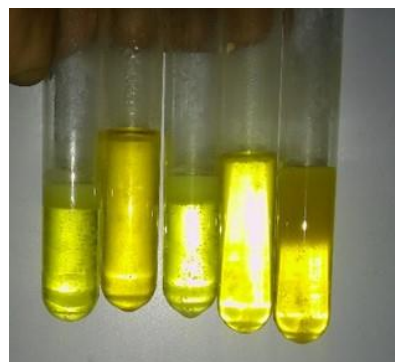
### 5.4.1 Reacción Xantoproteica

La fermentación ácido láctica del caparazón de camarón permitió la hidrólisis de las proteínas a aminoácidos, los cuales se identificaron cualitativamente por Reacción Xantoproteica.

De acuerdo a los resultados cualitativos de las 8 muestras (Figura 5.8), la prueba dio resultados positivos (coloración amarilla en la solución), confirmando la presencia de proteínas con aminoácidos portadores de grupos aromáticos, dos esenciales: fenilalanina y triptófano y uno no esencial, tirosina (Osuna-Lizárraga et al., 2014).



(a)



(b)

**Figura 5.8** Muestras de proteína, producto de la fermentación ácido-láctica con la adición de ácido nítrico y (b) resultado positivo de la prueba.

#### 5.4.2 Porcentaje de proteína total

Los resultados del análisis del porcentaje de proteína total presentados en la Tabla 5.2, indican un 10.42% de proteína total para los desechos de camarón. Mientras, el porcentaje el porcentaje promedio de proteína en las muestras producto de la fermentación<sup>1</sup> fue de 1.60 %.

El bajo porcentaje de proteína encontrado en estas muestras puede deberse al consumo de proteínas provenientes del desecho de camarón por las bacterias ácido lácticas identificadas, las cuales la utilizan como fuente de nitrógeno. Así también, la progresiva desproteinización del desecho de camarón y la hidrólisis del material proteico también dependen de procesos enzimáticos (Prameela, 2010 citado en Arévalo 2016, pág. 19).

**Tabla 5.3 Porcentaje de proteína en diferentes tipos de muestras**

Muestra	Fuente de carbono	Factor de proteína	% Proteína Total
<b>Desechos de camarón</b>	-	6.25	10.42
<b>Suero de leche</b>	-	6.25	0.70
<b>No de Experimento<sup>1</sup></b>			
<b>13</b>	Azúcar	6.25	1.44
<b>7</b>	Melaza	6.25	1.75
<b>8</b>	Melaza	6.25	1.51
<b>6</b>	Azúcar	6.25	1.03
<b>22</b>	Azúcar	6.25	1.40
<b>1</b>	Melaza	6.25	1.64
<b>10</b>	melaza	6.25	2.88
<b>5</b>	Azúcar	6.25	1.16
<b>% de Proteína promedio</b>			

<sup>1</sup> Material proteico obtenido en el inciso f del ítem 4.4.3 de cada experimento.

A pesar de la baja recuperación, la presencia de aminoácidos esenciales implica que el material proteico es de buena calidad con valor comercial y alimenticio. Luque (2009) indica que las rutas para la obtención de estos aminoácidos esenciales suelen ser largas y energéticamente costosas, y el uso de este material proteico como suplemento alimenticio justifica la inversión ya que se obtiene como un subproducto del proceso de fermentación ácido láctica.

Además, este proceso previene la destrucción parcial o conversión en productos sin valor comercial o tóxico de los aminoácidos; así también, reduce el gasto energético y de reactivos, y disminuye las descargas de contaminantes a efluentes líquidos, reduciendo los costos de tratamiento de agua. (Agullo et al. 2004)

## 6. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el comportamiento del proceso fermentativo, la calidad y el rendimiento de la quitina obtenida, son afectados principalmente por el tamaño de partícula y el tipo de sustrato, respectivamente. Sin embargo, no hay un efecto significativo de la concentración de inóculo bajo estas condiciones experimentales.

Así también, que la producción de ácido láctico depende del tamaño de partícula y del tipo de sustrato utilizado, donde la mayor producción fue al mayor tamaño de partículas y aplicando melaza como sustrato, con un rendimiento de  $3.79 \pm 0.20\%$ .

Es preciso señalar, que en todos los experimentos de fermentación ácido láctica, se observó una disminución de pH y un aumento del porcentaje de acidez total titulable (ATT). Con relación a los valores de concentración de inóculo de 5 y 10%, estos no tienen un efecto representativo en el comportamiento del pH y el ATT.

Por su parte, la caracterización, mediante observaciones microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas, confirmaron la presencia de dos cepas de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus paracasei* 1 y *Leuconostoc Mesenteroides cremoris*. Asimismo, en los residuos líquidos proteicos, se identificaron tres aminoácidos: fenilalanina, triptófano y tirosina. No obstante, este material es menor al disponible al inicio de la fermentación, con un porcentaje promedio de recuperación de proteína de 1.60 %.

## 7. RECOMENDACIONES

Separar las aletas de la cola del camarón mejora la extracción de pigmentos, para mejorar la calidad de la quitina producida.

Implementar un sistema de control automático.

Dado que se obtuvo un porcentaje de confiabilidad del 65% para la bacteria *Leuconostoc mesenteroides cremoris*, se recomienda complementar su caracterización usando métodos fenotípicos y genotípicos.

Los subproductos desechados al terminar la fermentación, tienen alto valor comercial, por lo que se recomienda:

Usar las cepas aisladas para la obtención de otros productos, tales como ensilados y vegetales fermentados.

Cuantificar y aprovechar los aminoácidos encontrados en la elaboración de suplementos alimenticios

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agulló, E., Peniche, C., Tapia, C., Heras, Á., Argüelles, W., Mayorga, A. (2004). Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.

Arévalo Illescas, A. P. (2016). Fermentación Láctica de la cascara de camarón con *Lactobacillus delbrueckii* para obtención de quitina. Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

Balderas, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Benítez, R. Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Colombia: Universidad de Lleida.

Bernal, N. y Trujillo C. (2010). Respiración Celular. Recuperado en noviembre 2017, en <http://larespiracioncelular.blogspot.com/2010/07/fermentacion-lactica-y-alcoholica.html>.

Cabarcas Lorduy, M., Marimón Bolívar, W. y Miranda Marzola, M. (2011). Diseño de un Proceso Económico y Competitivo para la Extracción de Quitina y Producción de Quitosano a partir de exoesqueletos de Camarón. Tesis de grado, Universidad de Cartagena, Colombia.

Cabrera, L. E. (2010). Recursos potencial de desechos de crustaceos . *Conferencia* . INAGUA.

Cira-Chávez, L. A. (2000). Escalamiento de un Proceso para la Recuperación de Quitina a Partir de desechos de camarón. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México.

Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M. y K. Shirai (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, Vol. 37(12), pp. 1359 - 1366.

Colina, M., Ayala, A., Rincón, C., Molina, J., Medina, J., Yuciarte, R., Vargas, J. y B. Montilla (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 15(1), pp. 21 - 43.

Escorcía, D., Hernández, D., Sánchez, M. y Benavente, M. (2009) “Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas” *Nexo, Revista Científica*, Vol. 22(2), pp. 45-55.



Fajardo, E. y Sarmiento, S. (2007). Evaluación de Melaza de Caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá, Colombia, pp. 31

García, I. J. (2007). Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis para optar al título de química en alimentos, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, México.

García Ruíz, A. (1998). Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso manchego, e identificación de la microbiota. Cuenca, España: Ediciones de la Universidad de Castilla- La Mancha, pp. 150.

Gómez, G., Nápoles, M., Núñez, C. y Martínez, J. (2008). Influencia de la concentración de melaza y extracto acuoso de soya sobre la velocidad específica de crecimiento de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001. Cultivos Tropicales, Vol. 29(4). [Consultado en octubre 2018]. Disponible en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362008000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000400003)

Hernández, P. C., Pantoja, A. L., y Turriago, M. S. (2002). Evaluación de la presencia de bacteriocinas en cultivos de bacterias ácido lácticas. Proyecto de grado para optar al título de ingeniero de producción agroindustrial, Universidad de la sabana, Bogota, Colombia.

Herrera, E. A. (2009). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Madrid: Universidad de Leon España.

Juárez-Castelán, C. (2010). Extracción de quitina A Escala Industrial mediante fermentación ácido láctica de desechos de camarón (*Litopenaeus vanameii*). VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras SIPAL.

LabM (2018). M17 Agar. Recuperado el 18 de octubre 2018 de <http://www.labm.com/products/m17-agar.asp>.

Luque G. M. Victoria. Estructura y propiedades de las proteínas. [Internet]. España: 2009 [Consultado en agosto, 2018]. Disponible en: [http://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf)

Marcia, E., Malespín, J., Sánchez, M. y M. Benavente (2011). Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo, Revista Científica*, Vol. 24(1), pp. 33-42.

Marcia, P. E & Malespín, R. J. (2013). Estudio de la fermentación láctica para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón y langostino. Trabajo de

diploma para optar al título de ingeniero químico, Universidad Nacional de Ingeniería, Nicaragua.

Mármol Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo<sup>1</sup>, K., Aiello, C., Chandler, C. y Gutiérrez, E (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU, ISSN: 2244 - 775X, pp. 53-58.

Mora, P. N y García, G. A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácidos lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos, Tesis para obtener el título de licenciado en química de alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Martínez, C. A. (2009). Propiedades estructurales y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido de ensilados de desechos de camarón. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias, Universidad de Sonora, México.

Osuna Lizárraga, A.E., Escobedo-Lozano, A.Y., Méndez Gómez, E., Vázquez-Olivares, A.E., Martínez-Sánchez, H.F. (2014). Extracción, caracterización parcial y evaluación de la digestibilidad in vitro de la proteína asociada al exoesqueleto del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Revista Bio Ciencias 2(4), pp. 293-301.

Owens, J. D. (2005). Enzimically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food Technology*, pp. 355-365.

Pacheco-López, N. A. (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosano: caracterización y aplicación. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México.

Páramo, L. (2013). Bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en la Industria. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Pascual Anderson M. R y V. Calderón de Pascual (2000). Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2da. edición. Editorial Díaz de Santos, S. A.

Pelczar, M., Reid, R. y Chan E. C. (1977). Microbiología. 4ta Edición, México: Editorial McGraw Hill.

Peniche, C. (2006). Estudio sobre quitina y quitosano. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias 2009. Universidad de La Habana. La Habana-Cuba, pp. 153-170.

Procesoliva (2001). Fases de la fermentación láctica. Recuperado el 10 de agosto 2018 de <https://procesoliva.wordpress.com/2011/03/02/fases-de-la-fermentacion-lactica/>

Rivera, C. (2008). Nicaragua y el sector pesquero y acuícola. Nicaragua: Instituto Nicaragüense de la Pesca y Acuicultura.

Skoog, D. A., Holler, F. J. y Niemann T. A. (2001). Principios de analisis instrumental (5ª ed). España: Mc Graw Hill.

Suarez, M. J. (2008). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca). Trabajo de grado presentado para optar al título de Zootecnista, Universidad de la Salle, Colombia.

Tortora, Funke y Case (2007). Introducción a la microbiología. 9ª Edición, Argentina: Editorial medica Panamericana.

Xu, Y., Gallert, C. y J. Winter (2008). Chitin Purification from Shrimp Wastes by Microbial deproteination and decalcification. Application Microbiology and Biotechnology, Vol. 79, pp. 687-697.

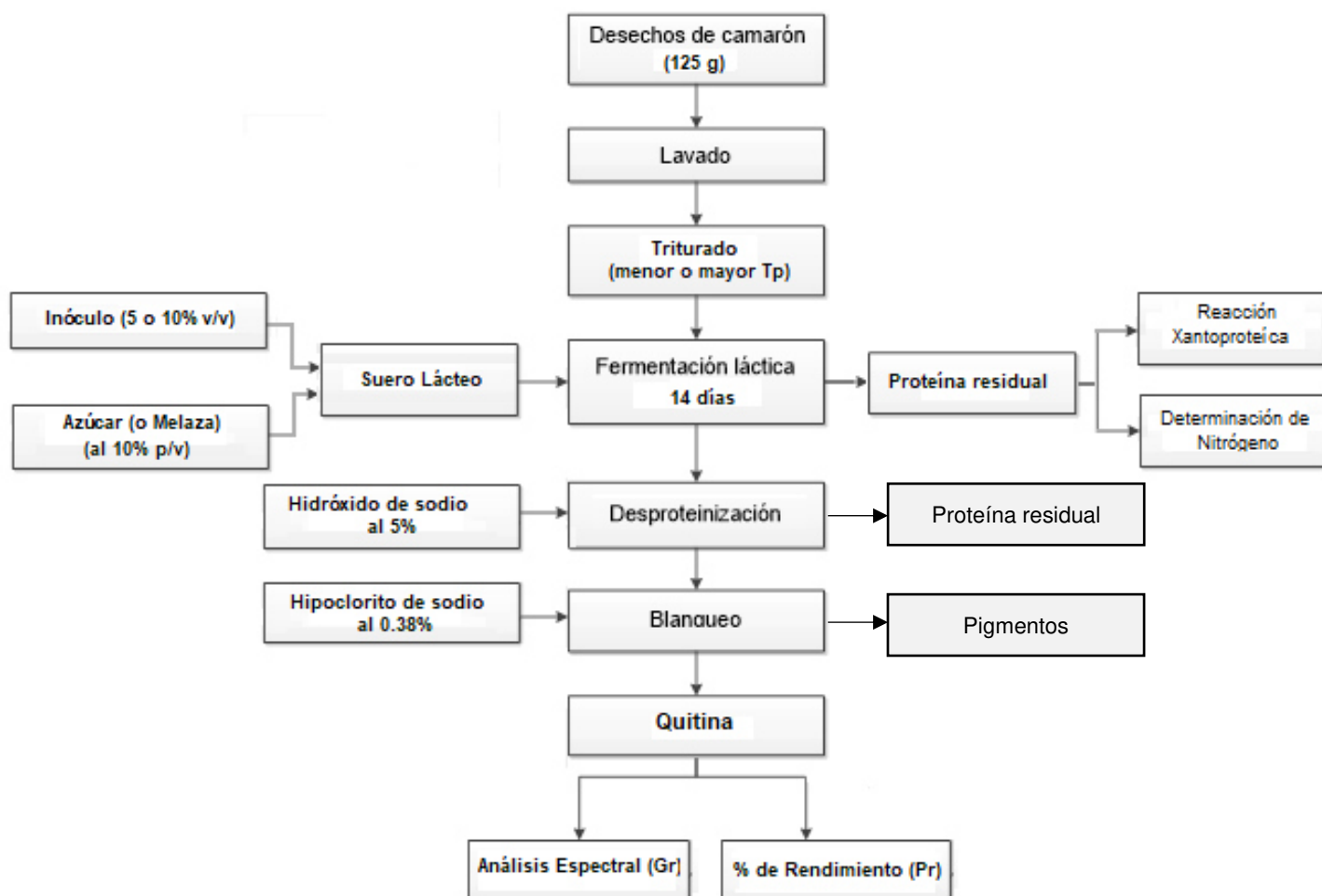
Zakaria, Z. (1997). Lactic acidp urification of chitin from prawn waste, using a horizontal rotating bioreactor. Gran Bretaña: I, Universidad de Loughborough.

Zakaria, S., G.M. Hall y G. Shama (1997). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry. Vol 33 (1), pp. 1-6

Zumbado, F. H. (2004). Análisis químico de los alimentos métodos clásicos. Cuba: Universidad de la habana.

## ANEXOS

### ANEXO I. Diagrama de Flujos para la obtención de quitina y proteína residual.



**Figura A.1** Diagrama de flujos del proceso de obtención de quitina y proteína residual a partir de desechos de camarón.

## ANEXO II. Métodos químicos para determinar los Parámetros medibles en el proceso de fermentación ácido-láctica.

### A.2.1 Determinación de la Acidez Total Titulable (ATT)

#### a. Introducción

Si se desea desarrollar una curva de titulación del licor muestra con una base fuerte se necesitan tres tipos de cálculos, donde cada uno corresponde a una etapa distinta de la titulación:

- 1) Antes del punto de equivalencia: Antes del punto de equivalencia, el pH se calcula de la concentración molar del ácido que no ha reaccionado.
- 2) En el punto de equivalencia: En el punto de equivalencia la solución es neutra y el pH = 7.00.
- 3) Después de este punto.

**Tabla A.1** Algunos indicadores ácidos/base importantes. Skoog, Holler y Niemann, 2001.

Nombre común	Intervalo de pH	pK <sub>a</sub> *	Cambio de color <sup>+</sup>	Tipo de indicador <sup>‡</sup>
Azul de timol	1.2 – 2.8	1.65§ 8.90§	R – Am Am – B	1
Amarillo de metilo	8.0 – 9.6	3.46§	R – Am R – N	2
Naranja de metilo	2.9 – 4.0	4.66§ 5.00§	Am – B R – Am	1
Verde bromocresol	4.0 – 3.1	6.12§	Am – B Am – P	2
Rojo de metilo	3.1 – 4.4	7.10§	Am – P Am – A	1
Púrpura de bromocresol	4.4 – 3.8	7.81§	Am – A Am – R	1
Azul de bromotimol	5.4 – 4.2		Am – R I – R	1
Rojo fenol	4.2 – 6.3		I – R I – A	1
Púrpura de cresol	6.3 – 5.2		I – A I – Am	1
Fenolftaleína	5.2 – 6.8		I – Am	2
Timolftaleína	6.8 – 7.6			
Amarillo de alizarina GG	7.6 – 6.8			
	6.8 – 8.4			
	8.4 – 7.6			
	7.6 – 9.2			
	9.2 – 8.3			
	8.3 – 10.0			
	10.0 – 9.3			
	9.3 – 10.5			
	10.5 – 10 – 12			

\*A una fuerza iónica de 0.1

<sup>+</sup>A = azul; I = incoloro; N = anaranjado; P = púrpura; R = rojo; Am =

	amarillo. $\ddagger(1)$ Tipo ácido: $\text{HIn} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{In}^-$ $\ddagger(2)$ Tipo básico: $\text{In} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{InH}^+ + \text{OH}^-$ $\S$ Para la reacción $\text{InH}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{In}$
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Previo al punto de equivalencia, la concentración del analito se calcula a partir de la concentración inicial del ácido y de los datos volumétricos. En el punto de equivalencia, los iones hidronio e hidróxido están presentes en concentraciones iguales, y la concentración del ion hidronio se obtiene directamente de la constante del producto iónico del agua. Después del punto de equivalencia se calcula la concentración formal del exceso de base, cuya concentración, se supone, es igual a la del ion hidróxido.

## b. Reactivos y materiales implicados en el procedimiento

En la Tabla A.2 se listan los reactivos y materiales que se utilizarán en la determinación de la ATT en las muestras del proceso de fermentación láctica de caparazón de camarón.

**Tabla A.2** Lista de reactivos para prueba de acidez total titulable.

Reactivos	Materiales
<b>Agua destilada</b>	Agitador magnético
<b>Fenolftaleína</b>	Balón aforado de 250 ml
<b>Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M</b>	Bureta de 25 ml
	pH-metro
	Pizeta
	Pipeta de graduada de 5 ml
	Probeta de 50 ml
	Matraz erlenmayer de 125 ml
	Matraz volumétrico de 100 ml
	Matraz volumétrico de 250 ml
	Soporte universal

## c. Preparación de Reactivos

- **Indicador de Fenolftaleína 1%:** Pesar 1.0 g de fenolftaleína y transfiera a un matraz volumétrico de 100 ml, llene hasta la mitad con agua destilada y disuelva. Complete el volumen con agua destilada y mezcle.
- **Solución de NaOH 0.1 M:** Pesar 0.999992 g de hidróxido de sodio de grado analítico y transfiera a un matraz volumétrico de 250 ml, llene hasta la mitad con agua destilada y disuelva. Complete el volumen con agua destilada y mezcle.

#### d. Determinación del porcentaje en peso/volumen (%p/v) del licor muestra

El tratamiento consiste en la toma de una alícuota de 2 ml de licor muestra en la que estará contenida una concentración desconocida de ácido láctico, esta será valorada con una solución de base fuerte con ayuda de un indicador hasta llegar a un pH de 8.3. El procedimiento es el siguiente:

Se mide 2 ml del licor muestra con una pipeta aforada y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Se agrega 50 ml de agua destilada y 5 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína. Se titula con una solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M que estará contenida en una bureta de 25 ml con agitación constante hasta el viraje del indicador. Finalmente se utiliza el pH-metro para comprobar el pH final establecido para esta prueba.

Tomando en cuenta el gasto final de NaOH determinaremos la concentración del ácido en las muestras de licor:

$$C_{ac}V_{ac} = C_{NaOH}V_{NaOH} \quad (A.1)$$

$$M_{Ac} = \frac{M_{NaOH}V_{NaOH}}{V_{Ac}} \quad (A.2)$$

Si en vez de calcular la molaridad del ácido, se prefiere expresar su porcentaje (relación peso/volumen), se procede de la siguiente manera:

$$\frac{g \text{ de Ac}}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 = \frac{M_{NaOH}V_{NaOH} \cdot PM_{Ac}}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 \quad (A.3)$$

### **A.2.2 Determinación de pH (Código 10301).**

#### **a. Equipo y Materiales.**

- Medidor de pH
- Electrodo de referencia de potencial constante y electrodo de vidrio
- Termómetro o sensor de temperatura.
- Agitador magnético

#### **b. Reactivos.**

- Agua destilada.
- Solución buffer de pH conocido para calibrar el equipo.

#### **c. Procedimientos.**

##### **Calibrar el equipo:**

- Para ello se debe seguir las instrucciones del medidor de pH. En la calibración se usan como mínimo dos de las soluciones buffer, cuyos valores de pH deben cubrir el rango de pH esperado por la muestra a medir.
- Llevar los buffers y la muestra a la misma temperatura. (Si el equipo lo permite utilizar compensación de temperatura). El valor correspondiente de pH de los buffers debe ser corregido a la temperatura de los mismos.

##### **Medida.**

- Medir el pH de la muestra indicando la temperatura de la misma. Realizar la medida con una agitación moderada para minimizar la entrada de dióxido de carbono y suficiente como para homogeneizar la muestra.
- Una vez finalizada la medida enjuagar y secar suavemente los electrodos y proceder a ubicarlos en la solución de preserva de los mismos.



### A.2.3 Determinación del contenido de Humedad.

#### Materiales

- Balanza analítica, plancha de calentamiento, capsula de aluminio, horno de convección, homogeneizador, desecador, mortero con su pilón, muestras.

#### Determinación de Humedad

- Tome una muestra, córtelo o tritúrelo finamente hasta homogeneizarlo y pese entre 5 y 7 gramos en una capsula de porcelana previamente tarada.
- Reporte la pesada con cuatro cifras significativas.
- Si la muestra es líquido coloque la cápsula en la plancha de calentamiento hasta secar completamente, **SIN QUEMARLO**. Luego lleve la cápsula a la estufa por un tiempo de 1 hrs, a una temperatura de 98-100 °C.
- Transcurrido el tiempo indicado retire la cápsula de la estufa, deje enfriar y pese de nuevo.

Realice pesadas sucesivas hasta que el peso sea constante en tres ocasiones. Reporte sus resultados en la siguiente tabla:

**Tabla A.3** Valores experimentales en determinación de humedad.

Muestra	Tiempo	Peso cápsula Vacía (g) P1	Peso cápsula + muestra antes de secado (g) P2	Peso cápsula + muestra después de secado (g) P3	% Humedad
1	1 h				
2	1h				
					<b>promedio</b>

#### Cálculos Típicos:

$$\%H = \frac{g \text{ H}_2\text{O evaporado}}{\text{Masa de muestra en g}} \times 100 \quad (\text{A.4})$$

Donde:

g. de H<sub>2</sub>O evaporada = P<sub>2</sub> - P<sub>3</sub>

Masa de muestra = P<sub>2</sub> - P<sub>1</sub>

## **A.2.4 Determinación del tamaño de partícula**

### **a. Materiales y equipo**

- Escobilla
- Marcador y etiquetas
- Juego de Tamices
- Agua destilada (aproximadamente 5 l por cada muestra)
- Bandejas (charolas) de metal grandes, cuyo peso se conoce
- Una pizeta, para limpiar los tamices
- Una báscula
- Un cronómetro
- Una hoja de datos y un lápiz
- Recipientes de fondo plano (palangana) de  $\pm 30$  cm de diámetro y  $\pm 8$  cm de altura

### **b. Medición**

Las bandejas que se utilizarán para secar las muestras en el horno deben ser pesadas antes de procesar las muestras. Tome una muestra representativa de 40 g y colóquela en un tamiz de 4 mm dentro de una palangana; llene la palangana de agua hasta llegar a 1.5 cm debajo del anillo superior del tamiz.

La muestra se distribuye uniformemente por todo el tamiz y se deja remojar durante 5 minutos. Mientras se remoja, retire los residuos orgánicos que están flotando sobre el agua.

A continuación, tamice la muestra durante 2 minutos, como sigue: mueva suavemente el tamiz hacia arriba y hacia abajo utilizando un ángulo pequeño ( $\pm 3.5$  cm de distancia vertical) de inclinación. Las partículas de la muestra deben salir de la superficie del agua con cada movimiento, pero mantenga un ángulo pequeño de inclinación para que el aire no entre por debajo de la malla. Lave con cuidado los lados y el fondo del tamiz (parte inferior) con agua destilada, sobre el siguiente tamiz colocado en una palangana. Vierta el material retenido en el tamiz en una bandeja debidamente marcada.

Ponga el tamiz de 6.3 mm en la siguiente palangana y pase toda el agua y muestra de la palangana anterior por el tamiz. Puede utilizar la pizeta con agua destilada para lavar la muestra de la primera palangana y verterlo en el tamiz, teniendo cuidado de no dirigir el chorro de agua directamente sobre la muestra.

El tamizado se repite y el tamiz se lava vertiendo su contenido en una bandeja debidamente pesada e identificada. Repita el mismo procedimiento con los tamices de 3.35 mm, 0.56 mm y 0.45 mm, y vierta también en una bandeja la fracción de  $<0.45$  mm que queda. Coloque las bandejas en el horno a una temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$  entre 18 y 24 horas, hasta que estén totalmente secas.

## **ANEXO III: Métodos la siembra por dilución y para determinar las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias**

### **A.3.1 Siembra por dilución**

- Dilución: Se mezcla la muestra, se toma 1.0 mL con una pipeta y se vierte en un tubo con 9 mL de solución reguladora de peptona; se agita el tubo con la muestra y se toma 1.0 mL de la dilución vertiéndose en un segundo tubo con 9 mL de solución reguladora de peptona. Se repite esta operación con un tercero, cuarto o más tubos hasta completar el número de requerido de diluciones, (1: 1000000) o  $10^6$ , se agitan cuidadosamente todas las diluciones.
- Vertido en placas: Se vierte con una pipeta estéril 1.0 mL de cada una de las diluciones realizadas en placas Petri debidamente identificadas y por duplicado.
- Incubación: Las cápsulas solidificadas se incuban en posición invertida durante 72 horas a 35 °C
- Computo de las colonias: Después de la incubación, se cuentan todas las colonias visibles de las cápsulas que contienen entre 30 y 300 colonias y se anotan los resultados.
- Calculo
  - a) Cuando en las capsulas examinadas no se observa ninguna colonia se reporta como Menor de  $1 \times 10^1$  UFC por gramo o mililitro.
  - b) Cuando se observan menos de 30 colonias en la dilución 1:10 se reporta como menos de  $3 \times 10^2$  UFC por gramo o mL.
  - c) Cuando hay más de 30 colonias se cuentan las colonias de las dos placas de la dilución escogida, se calcula la media con dos cifras significativas solamente y se multiplica por el inverso de la dilución correspondiente a fin de obtener el número de bacterias por gramo o mL.

$$\text{UFC/g} = \text{Promedio del Número de Colonias Contadas} * \text{Factor de dilución empleado en el cômputo.} \quad (\text{A.5})$$

### **A.3.2 Tinción de Gram.**

- Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota de agua.
- Se toma una colonia de cultivo y se frota en la gota de agua para formar una suspensión bacteriana homogénea.
- La muestra colocada en el portaobjetos se seca en el aire y para fijar el frotis se pasa varias veces de forma horizontal con el extendido celular hacia arriba por la flama del mechero.
- Las células fijadas al calor, primero son teñido cubriendo la muestra con una solución de cristal violeta, se deja reposar por 1 minuto después del cual, el exceso de colorante se elimina lavando con agua.

- El portaobjeto se cubre después con lugol y se deja reaccionar por 1 minuto, el exceso se elimina con agua.
- Con el portaobjeto inclinado se realiza una decoloración agregando con un gotero una mezcla de alcohol-acetona hasta que la solución deje de arrastrar el colorante.
- El portaobjetos con el frotis se cubre con la solución de safranina, se deja reaccionar durante 30 segundos finalmente, se elimina el exceso de colorante y se deja secar en el aire, las bacterias gram positiva se tiñen de púrpura por el cristal violeta, en cambio las bacterias gram negativa perderá la coloración inicial de cristal violeta y se tiñen de rojo debido a la safranina.

### **A.3.3 Prueba de la catalasa.**

- Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una muestra del cultivo fresco y se adiciona una gota de  $H_2O_2$  al 3 %
- La prueba es positiva cuando se pone en contacto la muestra con el  $H_2O_2$  y se produce una reacción inmediata liberando burbujas.

### **A.3.4 Prueba de oxidasa.**

- En una caja Petri se coloca un cuadro de papel filtro de aproximadamente 9  $cm^2$  impregnado con solución de clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %.
- Con un asa se toma las colonias aisladas en placa y se mezcla con el reactivo. La prueba positiva se da cuando el reactivo se oxida rápidamente en presencia del citocromo c produciendo coloración azul marino purpúreo lo que se toma como prueba positiva, si la prueba es negativa no habrá viraje.

### **A.3.5. Prueba de motilidad: Método de la gota pendiente**

- Tomar una gota de un cultivo líquido reciente (24 horas) usando un asa de siembra o una pipeta Pasteur estéril.
- Colocar en el centro de un cubreobjetos y añadir cuatro pequeñas gotas de aceite en los cuatro extremos.
- Colocar el portaobjetos excavado sobre el cubreobjetos, cuidando que la gota quede situada en el centro de la depresión.
- Dar la vuelta al portaobjetos.
- Colocar una gota de aceite de inmersión y observar con objetivo de inmersión (100x).

Esta técnica permite observar el desplazamiento rápido y rectilíneo o dando giros y volteretas en aquellas bacterias que tienen flagelos. Las bacterias inmóviles

presentan un movimiento vibratorio denominado movimiento browniano, debido al choque de las moléculas en una solución líquida.

### A.3.6 KIT RÁPIDO API 50 CH

#### a. Lista de materiales y reactivos

En la Tabla A.4 se presenta los reactivos y materiales utilizados para llevar a cabo la identificación de las bacterias, usando el sistema Api.

**Tabla A.4** *Reactivos y materiales sistema Api*

Reactivos	Materiales
<b>Galerías API 50 CH</b>	Pipetas Pasteur
<b>McFarland Standard, punto 2</b>	Gradilla para ampollas
<b>Programa informático de identificación ,apiwebTM</b>	Protege-ampollas (modelos grande y pequeño)
<b>Aceite de parafina</b>	Equipo general de laboratorio de bacteriología
<b>Medio MRS</b>	Tubos de ensayo
<b>API 50 CHL Medium</b>	Incubadora
<b>Agua destilada estéril</b>	Autoclave

#### b. Procedimiento

##### Selección de las colonias

- Verificar la pureza del cultivo.
- Cultivarla sobre medio MRS con agar 24 H a 30°C ó 37°C en anaerobiosis. La temperatura de incubación varía según el origen de la cepa.
- Caracterizar: cocos o cocobacilos, Gram (+), catalasa (-), no esporuladas inmóviles, anaerobias (estrictas o facultativas), cultivables sobre el medio MRS.
- Si se utilizan cepas liofilizadas o congeladas, realizar 2 subcultivos en caldo MRS antes del aislamiento sobre el medio MRS sólido.

##### Preparación de la galería

Cada galería está constituida por 5 filas conteniendo, cada una, 10 pozos numerados. El procedimiento es el siguiente:

- Se rotula la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Se reparte unos 10 ml de agua destilada estéril en los recipientes del fondo para crear una atmosfera húmeda.
- Se saca cada una de las filas de su embalaje, se separan en dos filas del 0-19, 20- 29, 30-39, 40-49 y se colocan en el fondo de la cámara de incubación.

## Preparación del inóculo

- Abrir un tubo de ensayo conteniendo agua destilada estéril (2 ml) sin aditivos.
- Tomar todas las colonias del cultivo (puro) con la ayuda de un escobillón o asa.
- Realizar una suspensión densa (S) en la ampolla.

## Posterior

- Abrir un tubo de ensayo conteniendo agua destilada estéril (5 ml)
- Realizar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión **S**: anotar dicho número de gotas (n).
- Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium e inocular con 2 veces el número de gotas citadas (o sea 2n).
- Esta suspensión debe utilizarse de inmediato.
- Homogeneizar.

## Inoculación de la galería

- Repartir el API 50 CHL Medium así inoculado sólo en los pozos, y recubrir los ensayos con aceite de parafina.
- Incubar a  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ó  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis durante 48 horas ( $\pm 6$  horas).

## c. Lectura e Interpretación

### Lectura de la galería

- Leer después de 24 y 48 horas de incubación.
- En cada tubo se investiga la acidificación producida, que se traduce por el cambio de color a **AMARILLO** del púrpura de bromocresol contenido en el medio.
- **En el ensayo de esculina (tubo n° 25) se observa un viraje de color de púrpura a NEGRO.**
- Anotar los resultados en la hoja de resultados.

### Interpretación

El perfil bioquímico así obtenido puede ser identificado a partir de la base de datos, con la ayuda del programa informático de identificación **apiweb™**.

## **ANEXO IV: Análisis del Material Proteico.**

### **A.4.1 Prueba cualitativa de la proteína (Reacción Xantoproteica)**

La Reacción Xantoproteica se usa para indicar la presencia de proteína en la muestra. Para llevar a cabo esta prueba, se tomó 5 ml de la proteína obtenida y se añadieron 10 gotas de ácido nítrico concentrado.

Posteriormente, se calienta la muestra en baño maría hasta que se visualiza, si es de color amarillo, se confirma la presencia de proteína y por consiguiente la presencia de los aminoácidos esenciales: triptófano, tirosina y fenilalanina (Osuna-Lizárraga et al., 2014).

### **A.4.2 Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl**

Para determinar el contenido total de proteína presente en la muestra se utiliza el método Kjeldahl. Para el cálculo de la proteína cruda se emplea la siguiente ecuación (Osuna-Lizárraga et al., 2014).

$$PC = \frac{(Gasto\ HCl - Gasto\ Blanco) * NHCl * 14.007 * 100 * 6.25}{Peso\ de\ la\ muestra(g) * 1000} \quad (A.6)$$

## ANEXO V: Diseño Experimental.

**Tabla A.5** Resultados Experimentales del diseño factorial.

No. de Experimentos	Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	Grado de Correlación	%Rendimiento
1	1	2	2	92.26	10.92
2	1	1	1	93.95	5.58
3	1	1	1	90.46	3.67
4	1	1	2	90.60	5.58
5	2	1	2	93.70	7.26
6	1	1	1	92.66	4.51
7	2	2	1	91.06	6.39
8	2	2	2	86.83	7.32
9	2	1	1	85.52	8.03
10	1	2	1	92.93	9.00
11	2	1	2	90.99	6.98
12	2	2	1	89.31	9.60
13	2	1	1	87.96	8.13
14	1	1	2	91.79	2.32
15	1	2	2	91.04	10.37
16	2	2	2	92.07	7.20
17	2	1	2	91.25	7.63
18	2	1	1	88.18	7.82
19	1	2	1	91.04	9.41
20	2	2	1	89.43	6.42
21	1	2	2	91.23	7.91
22	1	1	2	91.42	7.11
23	1	2	1	91.37	9.42
24	2	2	2	93.07	10.11

Donde:

- Tamaño de partícula 1: Menor a 3.35 mm,
- Tamaño de partícula 2: Mayor a 3.35 mm
- Porcentaje de Inóculo 1: 5% de concentración del inóculo (v/v),
- Porcentaje de Inóculo 2: 10% de concentración del inóculo (v/v),
- Sustrato 1: Azúcar como sustrato,
- Sustrato 2: Melaza como sustrato.



**Anexo V: Resultados de pH y Porcentaje de Acidez Total Titulable (ATT) de los Experimentos de fermentación ácido láctica.**

**Tabla A.6** Resultados de pH y ATT de los Experimentos de fermentación ácido láctica en el Reactor Madre.

Fecha	pH	ATT
20-09-2017	4.19	
21-09-2017	3.74	
22-09-2017	3.49	3.33
25-09-2017	3.43	3.60
26-09-2017	4.21	3.91
27-09-2017	3.50	3.78
28-09-2017	3.47	3.87
29-09-2017	4.51	3.33
02-09-2017	4.10	3.47
03-09-2017	3.39	3.47

**Tabla A.7** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 1, 15 y 21.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Menor a 3.35 mm	Melaza	10%	
Resultados del Experimento No. 1			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
01/03/2018	0	4.62	
05/03/2018	1	3.78	1.44
06/03/2018	2	3.61	1.53
08/03/2018	3	3.59	2.34
12/03/2018	4	3.57	2.88
13/03/2018	5	3.52	2.655
14/03/2018	6	3.52	2.925
Resultados del Experimento No. 15			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
01/03/2018	0	4.73	
05/03/2018	1	3.59	1.485
06/03/2018	2	3.52	1.71
08/03/2018	3	3.91	2.25
12/03/2018	4	3.62	3.645
13/03/2018	5	3.49	2.475
14/03/2018	6	3.52	2.52
Resultados del Experimento No. 21			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
01/03/2018	0	4.58	
05/03/2018	1	3.59	1.575
06/03/2018	2	3.52	1.305
08/03/2018	3	3.89	2.34
12/03/2018	4	3.51	2.79
13/03/2018	5	3.48	3.015
14/03/2018	6	3.49	2.925

**Tabla A.8** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 2, 3 y 6.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Menor a 3.35 mm	Azúcar	5%	
Resultados del Experimento No. 2			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
06/04/2018	0	5.7	
09/04/2018	1	3.79	1.08
10/04/2018	2	3.64	1.755
11/04/2018	3	3.54	1.845
17/04/2018	4	3.28	2.7
18/04/2018	5	3.31	2.34
Resultados del Experimento No. 3			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
06/04/2018	0	4.75	
09/04/2018	1	3.66	1.08
10/04/2018	2	3.56	1.44
11/04/2018	3	3.53	1.665
17/04/2018	4	3.35	2.34
Resultados del Experimento No. 6			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
14/02/2018	0	5	
15/02/2018	1	4.91	0.27
16/02/2018	2	4.28	0
19/02/2018	3	3.96	0.54
20/02/2018	4	3.66	1.035
21/02/2018	5	3.58	0.9
22/02/2018	6	3.5	0.99
23/02/2018	7	3.43	1.215

**Tabla A.9** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 4, 14 y 22.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Menor a 3.35 mm	Azúcar	10%	
Resultados del Experimento No. 4			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
06/04/2018	0	4.47	
09/04/2018	1	3.73	1.305
10/04/2018	2	3.55	1.665
11/04/2018	3	3.49	1.665
17/04/2018	4	3.27	2.565
Resultados del Experimento No. 14			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
14/02/2018	0	4.61	
15/02/2018	1	4.57	0.27
16/02/2018	2	4.14	0
19/02/2018	3	3.79	0.675
20/02/2018	4	3.64	0.81
21/02/2018	5	3.56	1.035
22/02/2018	6	3.48	1.305
23/02/2018	7	3.4	1.395
Resultados del Experimento No. 22			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
14/02/2018	0	4.82	0
15/02/2018	1	4.96	0.225
16/02/2018	2	4.43	-
19/02/2018	3	3.94	0.81
20/02/2018	4	3.73	1.035
21/02/2018	5	3.64	0.945
22/02/2018	6	3.56	1.125
23/02/2018	7	3.49	1.35

**Tabla A.10** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 5, 11 y 17.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Mayor a 3.35 mm	Azúcar	10%	
Resultados del Experimento No. 5			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
09-oct	0	4.26	
10-oct	1	4.79	0.68
11-oct	2	4.40	1.26
12-oct	3	4.04	1.76
16-oct	4	3.48	2.48
17-oct	5	3.62	2.51
18-oct	6	3.65	2.92
20-oct	7	3.91	2.66
23-oct	8	3.52	3.02
24-oct	9	3.77	3.07
Resultados del Experimento No. 11			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
11-oct	0	4.25	
12-oct	1	4.90	0.77
13-oct	2	4.08	1.40
16-oct	3	4.08	2.62
17-oct	4	3.60	3.60
18-oct	5	3.63	2.48
19-oct	6	3.63	2.48
20-oct	7	3.82	3.29
23-oct	8	3.84	2.75
24-oct	9	3.76	2.79
Resultados del Experimento No. 17			
Fecha	Días de muestreo	pH	Att
15-nov	0	3.90	
17-nov	1	3.94	1.48
20-nov	2	3.43	2.34
21-nov	3	3.42	2.20
22-nov	4	3.49	2.70
23-nov	5	3.49	2.80
24-nov	6	3.46	2.85
25-nov	7	3.48	3.65
26-nov	8	3.44	3.65

**Tabla A.11** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 8, 16 y 24.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Mayor a 3.35 mm	Melaza	10%	
Resultados del Experimento No. 8			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
09-oct	0	4.00	
10-oct	1	5.00	1.30
11-oct	2	4.11	2.16
12-oct	3	4.08	2.62
16-oct	4	3.57	3.33
17-oct	5	3.73	3.40
18-oct	6	3.70	3.42
20-oct	7	3.81	
23-oct	8	3.69	3.46
24-oct	9	3.80	3.60
Resultados del Experimento No. 16			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
15-nov	0	4.13	
17-nov	1	3.70	1.22
20-nov	2	3.64	2.79
21-nov	3	3.65	2.61
22-nov	4	3.70	3.33
23-nov	5	3.73	3.90
24-nov	6	3.70	3.95
25-nov	7	3.70	3.10
26-nov	8	3.43	3.10
Resultados del Experimento No. 24			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
14/02/2018	0	4.78	
15/02/2018	1	4.61	0.45
16/02/2018	2	4.17	0.00
19/02/2018	3	3.84	0.54
20/02/2018	5	3.83	1.62
21/02/2018	5	3.75	2.03
22/02/2018	6	3.73	1.58
23/02/2018	7	3.66	1.85

**Tabla A.12** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 9, 13 y 18.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Mayor a 3.35 mm	Azúcar	5%	
Resultados del Experimento No. 9			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
15-nov	0	4.29	
17-nov	1	3.82	1.17
20-nov	2	3.38	2.115
21-nov	3	3.39	2.38
22-nov	4	3.38	2.43
23-nov	5	3.45	3.2
24-nov	6	3.44	3.2
25-nov	7	3.47	3.2
26-nov	8	3.43	3.2
Resultados del Experimento No. 13			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
11-oct	0	4.60	
12-oct	1	4.69	0.77
13-oct	2	4.13	1.22
16-oct	3	3.52	2.12
17-oct	4	3.64	2.38
18-oct	5	3.61	2.41
19-oct	6	3.61	2.41
20-oct	7	4.00	2.84
23-oct	8	3.60	2.52
Resultados del Experimento No. 18			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
15-nov	0	4.21	
17-nov	1	3.83	1.3
20-nov	2	3.4	2.2
21-nov	3	3.43	2.43
22-nov	4	3.55	2.55
23-nov	5	3.51	3
24-nov	6	3.49	3.12
25-nov	7	3.49	3.2
26-nov	8	3.49	3.15

**Tabla A.13** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 10, 19 y 23.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Menor a 3.35 mm	Melaza	5%	
Resultados del Experimento No. 10			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
01/03/2018	0	4.74	
05/03/2018	1	3.6	1.26
06/03/2018	2	3.54	1.665
08/03/2018	3	3.83	2.16
12/03/2018	4	3.85	2.88
13/03/2018	5	3.53	3.105
14/03/2018	6	3.52	2.7
Resultados del Experimento No. 19			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
06/04/2018	0	5.4	
09/04/2018	1	3.96	1.26
10/04/2018	2	3.8	1.8
11/04/2019	3	3.71	2.115
17/04/2018	4	3.52	2.52
18/04/2018	5	3.53	2.925
Resultados del Experimento No. 23			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
06/04/2018	0	5.36	
09/04/2018	1	3.92	1.665
10/04/2018	2	3.81	1.71
11/04/2018	3	3.7	2.025
17/04/2018	4	3.58	2.61
18/04/2018	5	3.58	2.61



**Tabla A.14** Resultados de pH y ATT de los Experimentos No. 7, 12 y 20.

Condiciones de Operación			
Tamaño de partícula	Tipo de Sustrato	Porcentaje de Inóculo	
Mayor a 3.35 mm	Melaza	5%	
Resultados del Experimento No. 7			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
09-oct	0	4.49	
10-oct	1	4.96	1.04
11-oct	2	4.17	2.01
12-oct	3	3.94	2.61
16-oct	4	3.60	3.60
17-oct	5	3.70	3.73
18-oct	6	3.67	3.87
20-oct	7	3.80	3.96
23-oct	8	3.65	3.96
24-oct	9	3.77	3.82
Resultados del Experimento No. 12			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
11-oct	0	5.00	
12-oct	1	4.85	0.95
13-oct	2	4.27	1.62
16-oct	3	3.48	2.22
17-oct	4	3.63	2.34
18-oct	5	3.63	2.48
19-oct	6	3.78	3.40
20-oct	7	4.06	3.38
23-oct	8	3.86	3.60
Resultados del Experimento No. 20			
Fecha	Días de muestreo	pH	ATT
15-nov	0	4.05	
17-nov	1	4.00	1.44
20-nov	2	3.57	1.98
21-nov	3	3.60	3.15
22-nov	4	3.70	2.79
23-nov	5	3.67	3.35
24-nov	6	3.63	3.80
25-nov	7	3.62	3.70
26-nov	8	3.62	3.95

**ANEXO VI: Resultados del Porcentaje de Humedad y Tamaño de partícula del caparazón de camarón.**

**Tabla A.15** *Determinación del Porcentaje de Humedad de caparazón de camarón*

Muestra	Tiempo	Peso cápsula Vacía P <sub>1</sub> (g)	Peso cápsula + muestra antes de secado P <sub>2</sub> (g)	Peso cápsula + muestra después de secado P <sub>3</sub> (g)	% Humedad
1	1 h	94.7	100.2	96.8	38%
2	1h	103.5	109	106	45%
Promedio					41.5%

**Tabla A.16** *Datos del Análisis del rango de tamaño de partícula*

Muestra	Tamiz mm	Plato #	Peso del plato g	Peso seco del plato + muestra g	Peso muestra g	%muestra
<b>Triturado con licuadora</b>	6.3	1	67.8	67.9	0.1	
	3.35	2	50.9	53.9	3.0	10.5
	0.56	3	60.9	81.4	20.5	71.9
	0.45	4	52.5	54.5	2.0	7.0
	<0.45	5	54.5	57.5	3.0	10.5
<b>Total</b>					28.5	
<b>Triturado con procesador</b>	6.3	1	67.9	86.4	18.5	62.0
	3.35	2	50.5	56.7	6.2	20.8
	0.56	3	53.9	57.0	3.1	
	0.45	4	51.4	51.8	0.4	
	<0.45	5	50.0	51.6	1.6	
<b>Total</b>	5.14				29.8	

## **Anexo VII Número de muestras para la determinación del porcentaje de Proteínas total**

Se seleccionaron 8 muestras tomando en cuenta el diseño experimental el cual consta de dos replicas, para analizar el material obtenido en el inciso f del ítem 4.4.3.

***Tabla A.17*** muestras seleccionadas para el análisis de proteínas.

Muestras seleccionadas	Réplica 1	Réplica 2
<b>6</b>	3	2
<b>8</b>	24	16
<b>10</b>	19	23
<b>5</b>	11	17
<b>13</b>	9	18
<b>1</b>	21	15
<b>22</b>	4	14
<b>7</b>	12	20

## Anexo VIII Resultados del Rendimiento de quitina

Peso base húmeda: 125 gr caparazón de camarón

Humedad 41.5%=51.875 gr

Peso base seca = 73.125 gr

**Tabla A.18** Rendimiento final quitina

No. de Experimento	Peso seco (g)	Porcentaje de rendimiento final quitina %
18	5.7199	7.82
20	4.6953	6.42
17	5.5837	7.63
9	5.8746	8.03
16	5.2655	7.20
7	4.6737	6.39
11	5.1093	6.98
5	5.3138	7.26
8	5.356	7.32
12	7.0221	9.60
13	5.9474	8.13
10	6.5871	9.00
15	7.5871	10.37
21	5.7871	7.91
1	7.9871	10.92
6	3.3	4.51
14	1.7	2.32
22	5.2	7.11
24	7.4	10.11
4	4.0871	5.58
23	6.8871	9.41
3	2.6871	3.67
2	4.0871	5.58
19	6.8871	9.41
Promedio	-	7.44
Rango		Max:10.92 – Min:2.32

## Anexo IX Resultados del Análisis espectral IR

**Tabla A.19** Grado de correlación de quitina (Análisis espectral IR)

No. Experimento	Sustrato	Nivel de inoculo o concentración	Tamaño de partícula	Grado de correlación quitina comercial
5	Azúcar	5%	Mayor	93.70 %
7	Melaza	5%	Mayor	91.06%
8	Melaza	10%	Mayor	86.83%
11	Azúcar	10%	Mayor	90.99%
12	Melaza	5%	Mayor	89.31%
13	Azúcar	5%	Mayor	87.96%
9	Azúcar	5%	Mayor	85.52%
16	Melaza	10%	Mayor	92.07%
17	Azúcar	10%	Mayor	91.25%
18	Azúcar	5%	Mayor	88.18%
20	Melaza	5%	Mayor	89.43%
2	Azucar	5%	Menor	93.95%
1	Melaza	10%	Menor	92.26%
3	Azucar	5%	Menor	90.46%
4	Azucar	10%	Menor	90.60%
6	Azucar	5%	Menor	92.66%
10	Melaza	5%	Menor	92.93%
14	Azucar	10%	Menor	91.79%
15	Melaza	10%	Menor	91.04%
19	Melaza	5%	Menor	91.04%
21	Melaza	10%	Menor	91.23%
22	Azucar	10%	Menor	91.42
23	Melaza	5%	Menor	91.37%
24	Melaza	10%	Mayor	93.07%

## Anexo X. Tratamiento Estadístico ANOVA

### A.10.1 Resultados del ANOVA para Grado de Correlación (Gr)

**Tabla A.20** Análisis de Varianza para Gr - Suma de Cuadrados Tipo III.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Tp</b>	19.046	1	19.046	7.07	<b>0.0171</b>
B: sust	0.416067	1	0.416067	0.15	0.6994
C: C In	6.38602	1	6.38602	2.37	0.1431
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1.11802	1	1.11802	0.42	0.5284
<b>AC</b>	17.5446	1	17.5446	6.52	<b>0.0213</b>
BC	3.88815	1	3.88815	1.44	0.2470
ABC	8.83307	1	8.83307	3.28	0.0889
RESIDUAL	43.0768	16	3.05352		
TOTAL (CORREGIDO)	100.309	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla A.21** Medias por Mínimos Cuadrados para Gr con intervalos de confianza del 95.0%.

Level		Count	Mean	Stnd. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN		24	90.8383			
Tp						
1		12	91.7292	0.473665	90.725	92.7333
2		12	89.9475	0.473665	88.9434	90.9516
sust						
1		12	90.7067	0.473665	89.7025	91.7108
2		12	90.97	0.473665	89.9659	91.9741
C In						
1		12	90.3225	0.473665	89.3184	91.3266
2		12	91.3542	0.473665	90.35	92.3583
Tp by sust						
1	1	6	91.8133	0.669863	90.3933	93.2334
1	2	6	91.645	0.669863	90.225	93.065
2	1	6	89.6	0.669863	88.18	91.02
2	2	6	90.295	0.669863	88.875	91.715
Tp by C In						
1	1	6	92.0683	0.669863	90.6483	93.4884
1	2	6	91.39	0.669863	89.97	92.81
2	1	6	88.5767	0.669863	87.1566	89.9967
2	2	6	91.3183	0.669863	89.8983	92.7384
sust by C In						
1	1	6	89.7883	0.669863	88.3683	91.2084
1	2	6	91.625	0.669863	90.205	93.045
2	1	6	90.8567	0.669863	89.4366	92.2767
2	2	6	91.0833	0.669863	89.6633	92.5034

**Nota:**

**Tp: Tamaño de partícula**

1: Menor (< 0.45 a 3.5 mm)

2: Mayor (3.35 a > 6.3 mm)

**Sust: Sustrato**

1: Azúcar

2: Melaza

**C In: Concentración de Inóculo**

1: 5%

2: 10%

### A.10.2 Resultados del ANOVA para Porcentaje de Rendimiento (Pr)

**Tabla A.22** Análisis de Varianza para Pr - Suma de Cuadrados Tipo III.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: sust	36.1376	1	36.1376	18.33	<b>0.0006</b>
B: Tp	2.0945	1	2.0945	1.06	0.3180
C: C In	0.310538	1	0.310538	0.16	0.6967
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	30.5327	1	30.5327	15.49	<b>0.0012</b>
AC	0.825104	1	0.825104	0.42	0.5269
BC	0.262504	1	0.262504	0.13	0.7200
ABC	0.738504	1	0.738504	0.37	0.5491
RESIDUAL	31.5473	16	1.97171		
TOTAL (CORREGIDO)	102.449	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



**Tabla A.23** Medias por Mínimos Cuadrados para Pr con intervalos de confianza del 95.0%.

Level	Count	Mean	Stnd. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	24	7.44542			
sust					
1	12	6.21833	0.40535	5.35903	7.07764
2	12	8.6725	0.40535	7.81319	9.53181
TP					
1	12	7.15	0.40535	6.29069	8.00931
2	12	7.74083	0.40535	6.88153	8.60014
C In					
1	12	7.33167	0.40535	6.47236	8.19097
2	12	7.55917	0.40535	6.69986	8.41847
sust by TP					
1 1	6	4.795	0.573252	3.57976	6.01024
1 2	6	7.64167	0.573252	6.42642	8.85691
2 1	6	9.505	0.573252	8.28976	10.7202
2 2	6	7.84	0.573252	6.62476	9.05524
sust by C In					
1 1	6	6.29	0.573252	5.07476	7.50524
1 2	6	6.14667	0.573252	4.93142	7.36191
2 1	6	8.37333	0.573252	7.15809	9.58858
2 2	6	8.97167	0.573252	7.75642	10.1869
TP by C In					
1 1	6	6.93167	0.573252	5.71642	8.14691
1 2	6	7.36833	0.573252	6.15309	8.58358
2 1	6	7.73167	0.573252	6.51642	8.94691
2 2	6	7.75	0.573252	6.53476	8.96524

**Nota:**

**TP: Tamaño de partícula**

1: Menor a 3.35 mm

2: Mayor a 3.35 mm

**Sust: Sustrato**

1: Azúcar

2: Melaza

**C In: Concentración de Inóculo**

1: 5%

2: 10%